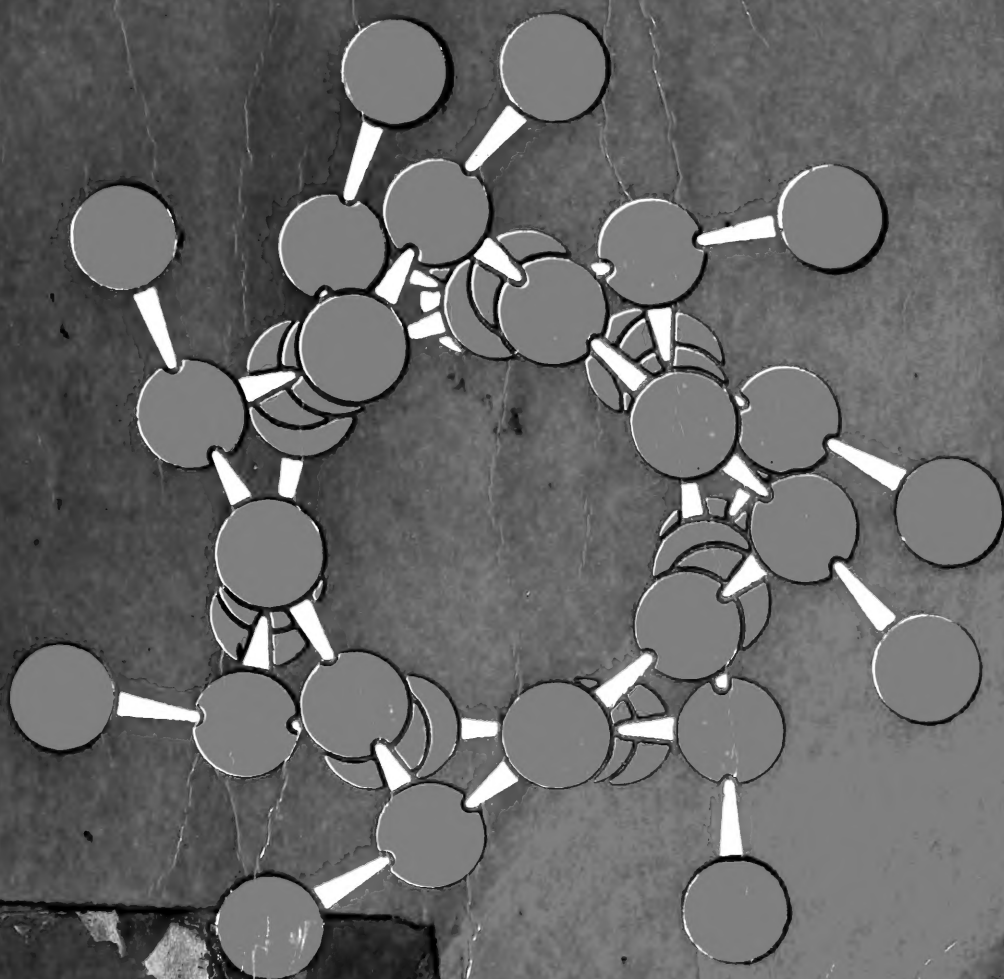


# 生物化学

〔美〕 LUBERT STRYER

唐有祺 张惠珠 吴相钰 顾孝诚 林性玉 章有章 译校



北京大学出版社













# 生 物 化 学

〔美〕 LUBERT STRYER

唐有祺 张惠珠 吴相钰 译校  
顾孝诚 林性玉 章有章



北 京 大 学 出 版 社

中科院植物所图书馆



S0003390

25602

## 内 容 提 要

本书为美国和其他英语国家通用的生物化学教科书。其特点是从分子水平讲述生物化学,以生物大分子的三维结构和它们的生物功能之间的相互关系为主题,图文并茂。全书共分5篇37章。第一篇为构象和动力学——以蛋白质的三维结构与其生物化学活性之间的关系为实例;第二篇为代谢能的产生和贮藏;第三篇为大分子前体的生物合成;第四篇为信息——遗传信息的贮藏、传递和表达;第五篇为分子生理学——生理过程中信息、构象和代谢的相互作用。全书插入化学分子结构式、各种三维结构模型、电子显微照片等共1300余张图。每章均附有参考文献目录和习题,书末还有习题答案、全书索引和20张彩色图。本书还加了原著第三版增改的正文和图,列为第六篇。

本书叙述详明、概念准确、原理清晰、内容新颖、文笔流畅、有条有理、有血有肉、发人思考、引人入胜、可读性高;既适于作教材,又适于自学,为学习和从事生命科学研究的人对生命现象的认识深入到分子水平提供了一条捷径。

本书可供大学理、工、农、医各专业师生教授和学习生物化学之用,也可供从事生命科学研究的人员学习参考。

Lubert Stryer

## BIOCHEMISTRY

Second Edition

W. H. Freeman and Company

## 生 物 化 学

〔美〕Lubert Stryer 著

唐有祺 张惠珠 吴相钰 译校  
顾孝诚 林性玉 章有章

责任编辑:孙德中 赵学范

\*

北京大学出版社出版

(北京大学校内)

国防科工委印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

787×1092毫米 16开本 70印张 1747千字

1990年5月第一版 1990年5月第一次印刷

印数:0001—4,000册

ISBN 7-301-00405-2/O·66

定价:29.60元

## 译 序

在生物化学的入门书中, 我比较欣赏 Lubert Stryer 著述的这个教本。它取材适当, 图文并茂, 讲解有条有理, 是一本有血有肉的好书。我特别感到难得的是这本书写得既有助于主修或出身于化学的人进入生命科学这个迷人的领域, 也为学习和从事生命科学的人对生命现象的认识深入到分子水平提供了一条近乎捷径的通道。

生物学进入分子水平是一件完成于50年代前后, 即从1945到1965年间的二十年中的大事。它的发生也是顺理成章和水到渠成的。当生物学已经发展到了若无关于蛋白和核酸这两类生物大分子三维结构的确切知识几乎无法前进的时候, 正好 x 射线晶体学和结构化学已经成长到足以来担当这项带有突破性质的任务了。

当时生物学在其自身的发展中已逐渐明确: 蛋白作为一类分子, 既可为生物体充当构架材料, 也可为生命执行各种特殊使命; DNA (去氧核糖核酸) 则充当生命之蓝图, 即为决定生物总体设计的分子。奠立于1912年的 x 射线晶体学从30年代起就开始测定一系列有机物的晶体结构, 到50年代发展到能测定蛋白的晶体结构了。其次, 结构化学在整个30年代中不但为大量关于分子结构及其与性能关系的信息所充实, 而其更令人瞩目的发展则为对化学键本质的认识进入了一个新的阶段。这两项发展为奠立分子生物学作出重大贡献的 $\alpha$ -螺旋模型(1951)、DNA双螺旋模型(1953)、肌红(1957)和血红蛋白(1959)以及溶菌酶(1965)和羧肽酶A(1967)的晶体结构工作创设了条件, 而其中DNA双螺旋模型的提出为生物学进入分子水平打开了一个突破口。

生物学自进入分子水平以来, 发展大有一日千里之势。分子水平给予了生命科学不可限量的活力和前景。关于生命的神秘色彩更难于立足了。生命的本质问题, 到了原子和分子的水平, 当能从物理和化学的规律中迎刃而解。在这个水平上, 还难于在物理和化学之外设想生物所特有的规律。

多年来, 化学一直向往着分子工程学这样的目标。分子工程学的任务是按所需性能设计分子, 并据以合成分子。化学在这方面也取得了一定的成就。而进入分子水平后的生物学在这方面颇有后来居上之势。当前, 基因工程已发展到蛋白工程, 它们是比较系统而典型的分子工程。显然, 化学并未置身于这些发展之外。

为了早日译出这本书, 我在五年前约请张惠珠、吴相钰、顾孝诚、林性玉、章有章以及蔡小海、严有为和赵宝光等同志参加工作, 其中张惠珠和吴相钰教授还做了不少校订工作。原书中大量彩色图已改成黑白图, 以便降低本书的成本。北京大学出版社在这方面做了大量工作。我谨向参加校译和编辑工作以及其他为本书的出版做了工作的同志致以深切的谢意。

正当本书第二版的译稿即将付印出版之时, 第三版问世了。与第二版相比, 第三版在文和图两方面增、删、改、易之处甚多。为了使新版的译文能早日与读者见面, 我们在可能的最短时间内, 将正文中增改的部分全部译出, 并摘要复制约150幅新增的图, 列为第六篇。

唐有祺 敬识

1987年6月8日于  
北京大学中关村

### 第三版序言

重组DNA技术已经使生物化学发生了深刻的变化。现在基因组已经是一本打开的书——任何一段都可被读译出来。DNA中千百万个碱基的克隆和序列测定极大地丰富了我们对于基因和蛋白质的认识。诚然，重组DNA技术已经导致了分子遗传学和蛋白质化学的整合。目前，正在分子水平上解释基因型和表现型之间错综复杂的相互作用。这些收获的成果之一就是深入认识基因组是如何组成的以及其表达是如何被控制的。不久就要研究生长和发育的分子机理。基因组的破译也提供了极为丰富的有关氨基酸顺序的信息，这些信息照亮了蛋白质研究的整个领域。利用转染的细胞，可以大量生产稀少的蛋白质。而且，可以用定位突变的方法产生精心设计的新的蛋白质，于是可以阐明蛋白质如何折叠、如何催化反应、如何转换信号、如何转运离子、如何使不同形式的自由能发生相互转变。

重组DNA的革命也大大地丰富了我们对于分子进化的了解。已经开始考察蛋白质的族(family)和超族(superfamily)。蛋白质水平上的不变和变异正是作为其背景的基因的复制和歧变的生动表达。复杂蛋白质的基因显示出为功能单位编码的外显子在进化过程中合到一起来了。纵观整个自然界可看到众多重复出现的结构上的和机理上的特点，它们证明所有形式的生命根本上是统一的。具有催化特性的RNA的发现使我们看到了生命进化早期的一个RNA的世界，它存在于DNA和蛋白质出现之前。核糖核苷酸在代谢作用中无处不在而且起着核心作用，这正是它们的古老来源的反映——正是早期的RNA世界的反映，那时RNA既起着基因的作用，又起着酶的作用。

这些显著的进展使得教授生物化学的方式不能不发生重大的变化。我改变了这本书的结构，提出了一种新的框架，以便把生物化学的基本题材和原理都放进去。本书以一个新的部分开始，此篇名为生命的分子设计，它概述了生命的核心分子——DNA、RNA、蛋白质以及它们的相互作用。这部分中也介绍了研究蛋白质和基因的重组DNA技术和其它实验方法。这一介绍使读者具备了随后仔细研究蛋白质的结构和功能的条件。这一新的组织材料的方法也使得代谢作用的教学内容丰富了。在结构上的其他重要改变是增加了碳水化合物一章和蛋白质到位一章。本书的许多章节都已全面改写，并且加入了几百幅新的插图。我曾试图保留生物化学作为一门学科的统一性。我的目的是使这门动人的语言易被理解，同时又不失去它那美妙的形象。

我感谢 Alexander Glazer, Daniel Koshland 和 Alexander Rich, 他们鼓励我改写这一版。如果没有他们热情的支持和有益的建议，我不会开始这种努力。

出乎意料，这一版的计划是在远离耶鲁、斯坦福和阿斯彭(Aspen)的地区作出的，前两版的计划是在这些地方作出的。1985年12月，我和全家到尼泊尔去，在珠穆朗玛地区旅行。在加德满都渡过了有意义的两天后，我们正准备登上鲁克拉(Lukla)的飞机。只是由于得到了令人失望的消息，说是大雪封闭了跑道，我们才不得不回去。于是我们乘着四轮兽力车向阿那波拿(Annapurna)区域进发，但由于大雨冲坏了道路，我们不得不迟回来一天。不能到达高耸的喜马拉雅山，于是我们的旅游日程发生了急遽的变化。我们带着厚皮外衣和适



于北极的睡袋飞到了曼谷，那里气温高达95华氏度。我们不是在12,000英尺的高度远足，而是在海平面上的旅馆游泳池里游泳。这一地理位置的改变却带来了意想不到的收获。我能够不慌不忙地回忆自从我编写第二版以来生物化学的令人瞩目的发展。我有足够的时间来思索、想像和计划这本书的写作。再好不过的是，我得以和我的儿子 Daniel 交流思想，并且从他的看法中有所收获。当时他是主修人类生物学的大学四年级学生。

Alexander Glazer, Richard Gumport, Roger Koeppe, James Rawn, Carl Rhodes 和 Peter Rubenstein 校阅了全部手稿。我从他们渊深透辟的批评中获得了极大的教益。Steve Block 等许多人也给予了有价值的建议和帮助。在插图的说明中我对许多幅精美和内容丰富的插图的作者们道了谢。我也要感谢结晶学家们，他们把自己已解决的原子坐标放在蛋白质数据库 (Protein Data Bank) 中，这是一份保存在布鲁克海文国家实验室 (Brookhaven National Laboratory) 中的资料。许多说明分子结构的图形是用我们系的计算机图形绘制设备作出的。David Austen 和 William Hurja 帮助我使用了这些精美的设备系统。

我所以能集中精力于本书的写作，是因为我的办公室中有一位能手 Joanne Tisch。她在打印手稿和校对中起了关键性作用。她的机敏、智慧和热情使我的负担大为减轻。国家医学图书馆的 Medline 文献检索系统给我在查阅文献方面以极大的便利。斯坦福大学的赖恩 (Lane) 医学图书馆和法尔康奈尔 (Falconer) 生物学图书馆的工作人员在寻找书籍和文献的出处方面对我帮助最大。

Andrew Kudlacik 编辑了本书，使形式和内容均为精美。Mike Suh 在设计每一页时都使文和图统一起来。Susan Moran 极其认真负责地校对了数千页打印稿、插图和校样。我还要感谢 Tom Cardamone 和 Shirley Bary，他们绘制了许多精美绝伦的插图。

我十分感谢我的全家对我进行此项工作的始终不渝的支持，这项工作比所预期的要艰苦得多。我的儿子，Michael 和 Daniel，现在都在从事他们自己的工作，但还从远处给我鼓舞。我的夫人 Andrea 恰到好处地给我批评、建议和鼓励。还有许多人伸出了热情的手，表示对于继续进行有关生物化学的对话有兴趣，这些都是我的精神营养。在这样一段美好时期从事这一工作，我感到非常荣幸。

Lubert Stryer

1987年12月

## 第二版序言

过去几年中生物化学方面的新发现层出不穷。这样的进展大大地丰富了我们对于生命的分子基础的了解,也开辟了许多新的研究领域。DNA核苷酸顺序的测定,基因新组合的建造和克隆,代谢控制机理的阐明,通过膜的转运和转化过程的阐明等,就是近代研究中的一些热门。我在这次再版中的一个目的就是把新知识组织到教本中去。为了提高本书的教学效果,我试图在可能时把新材料的说明集中到共同的标题下面并且引用重复出现的主题。我也试图把生物化学领域的美妙思路介绍给读者。

我感谢Thomas Emery, Henry Epstein, Alexander Glazer, Roger Kornberg, Robert Martin和Jeffrey Sklar在此次再版编写过程中所作的咨询、评论和鼓励。Robert Baldwin等许多人也给予了有益的帮助。

Patricia Mittelstadt是本书两版的编辑。我衷心感谢她的关键性的坚持不懈的贡献。我也感谢Donna Salmon的精彩绘图。David Clayton等多人慨然提供了多幅精美的电镜照片。Betty Hogan打印手稿,为手稿的准备起了必不可少的作用。Gary Leiden和Karen Marzotto作了仔细的校对。我也要感谢Michael Graves杰出的摄影。

我的妻子Andrea和儿子Michael和Daniel愉快地允许这本书成为我们家庭的一名成员。我衷心感谢他们的耐心和轻快的精神。Andrea对于再版的格式和设计提出了许多宝贵意见,像对第一版一样。

我接到过第一版读者的许多来信,深受鼓舞。他们的意见和批评鼓舞和激励了我。我期望将来继续和读者对话。

Lubert Stryer

1980年8月

## 第一版序言

本书是我在耶鲁大学和斯坦福大学为本科生、研究生和医学院的学生讲授生物化学课程的产物。我的目的是提供生物化学原理的导论，以便使读者掌握其基本概念和术语。我也希望能对生物化学领域中各种发现的过程进行评价。我对于生物化学原理的叙述是围绕着以下几个主题来组织的：

1. 构象——以蛋白质的三维结构与其生物学活性之间的关系为实例；
2. 代谢能的产生和贮藏；
3. 大分子前体的生物合成；
4. 信息——遗传信息的贮藏、传递和表达；
5. 分子生理学——生理过程中信息、构象和代谢的相互作用。

蛋白质、核酸和其它生物分子的三维结构的阐明近年来为我们对于生命的分子基础的了解作出了许多贡献。为了在分子水平上描绘结构和动态的生动情景，我运用了大量的分子模型，以便强调生物化学的这一个方面。现代生物化学中另一个令人鼓舞的方面就是它与医学之间不断增多的相互影响。我列举了这种相互影响的许多例子。关于分子病（如镰刀型细胞贫血症）和药物（如青霉素）的作用机理的讨论丰富了生物化学的教学。最后，我还试图阐明目前在生物化学中几个富有挑战性的研究领域，例如激感性的分子基础。

在编写本书的过程中，我从许多位同事和学生中得到了许多十分有益的建议、评论和鼓励。Leroy Hood, Arthur Kornberg, Jeffrey Sklar和William Wood对全书的结构出了许多主意。Richard Caprioli等阅读了大部分手稿并提出了许多极有价值的建议。我非常感谢Frederic Richards，因为他提供了关于大分子构象的思想并且多方帮助我描画三维结构。Deric Bownds等给我提供了许多精美的电镜照片。Richard Dickerson等多人在编写过程中的不同时候给我建议和评论，我也非常感谢他们。

我感谢联邦基金会（Commonwealth Fund）给我的一笔经费，它使我能够开始这本书的写作。Robert Glaser, Terrance Keenan和Quigg Newton在关键时刻支持了我。我编写此书的目的之一就是要达到图文并茂并且用图画生动地说明化学变化和三维结构。我特别感谢Donna Salmon, John Foster和Jean Foster，他们为我画图，做图解和绘制曲线。耶鲁大学的许多人为这一项目的完成帮了忙。我特别要谢谢Margaret Banton和Sharen Westin打印手稿，William Pollard给空间填充模型照相，Martha Scarf制作分子结构的计算机作图，书中的许多图都是以计算机图为根据绘制的。John Harrison和他在克莱茵科学图书馆（Kline Science Library）的同事们在各方面给了很多帮助。

本书的大部分是在阿斯彭（Aspen）写成的。我要感谢阿斯彭物理中心（Aspen Center of Physics）和吉文病理生物学研究所（Given Institute of Pathobiology），好几个夏季他们都是我的热情的东道主。在吉文研究所秀丽的花园里和在附近茫茫荒野远足途中所进行的关于生物化学和分子医学的激动人心的讨论，我至今记忆犹新。

我也深深感谢我的妻子Andrea和我的孩子Michael和Daniel，在我写这本书时他们给我鼓

励、有耐心并且创造良好的气氛。他们确实和我一起进行酝酿，这一酝酿时期比预期的长得多。Andrea对于书的格式和设计提出了宝贵意见，而且还使我注意到十三世纪一位中国学者的话：如果我期待一本书尽善尽美，那就永远不会完成它。

我欢迎读者的意见和批评。

Lubert Stryer

1974年7月

# 目 录

## 第1章 分子和生命

分子模型 (1) 空间、时间和能量 (2) 本书的设计 (4)

## 第一篇 构象和动力学

### 第2章 蛋白质的结构和功能导论

8

蛋白质由氨基酸构成 (9) 补充二十种基本氨基酸的特殊氨基酸 (12) 氨基酸通过肽键相联形成多肽链 (12) 一个或几个多肽链组成蛋白质 (13) 蛋白质可以通过各种方法予以提纯 (13) 蛋白质具有为基因所规定的唯一氨基酸顺序 (15) 测定氨基酸顺序的实验方法 (15) 多肽链的构象 (19) 周期性结构:  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠片和胶原螺旋 (20) 多肽链可以通过  $\beta$  转折扭转走向 (23) 蛋白质建筑中的结构层次 (23) 氨基酸顺序规定三维结构 (24) 蛋白质通过  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  线段的缔合进行折叠 (26) 概要 (27) 附录: 酸-碱概念 (28) 习题 (30)

### 第3章 氧的运载体: 肌红蛋白和血红蛋白

32

氧与一个血红素辅基结合 (32) x 射线晶体学在原子水平上揭示三维结构 (33) x 射线研究肌红蛋白的步骤 (35) 肌红蛋白有紧密的结构和高含量的  $\alpha$  螺旋 (37) 肌红蛋白中的氧结合部位 (38) 血红素的受阻环境对可逆氧合作用是必要的 (40) 远侧组氨酸的存在使一氧化碳的结合减少 (40) 肌红蛋白的结构在溶液中和晶态中很相似 (41) 非极性相互作用对稳定肌红蛋白的构象很重要 (42) 松散的肌红蛋白能自发地重新折叠成活性的分子 (42) 血红蛋白由四个多肽链组成 (43) 血红蛋白的 x 射线分析 (43) 血红蛋白的四级结构 (44) 血红蛋白的  $\alpha$  链和  $\beta$  链与肌红蛋白十分相似 (44) 氨基酸顺序中的关键性残基 (45) 血红蛋白: 进化中向前迈出的一步 (46) 概要 (46) 习题 (47)

### 第4章 血红蛋白: 一种变构蛋白质

49

肌红蛋白和血红蛋白之间功能的差异 (49) 氧与血红蛋白的结合是协作的 (49) 血红蛋白协作结合氧促进氧的运载 (52)  $H^+$  和  $CO_2$  促进  $O_2$  的脱去 (波尔效应) (52) DPG 降低氧亲和性 (53) DPG 的临床意义 (53) 胎儿血红蛋白对氧的亲和性高 (54) 变构效应起源于亚基之间的相互作用 (55) 氧合后血红蛋白的四级结构显著变化 (55) 脱氧血红蛋白受不同肽链之间的盐键所约束 (56) 铁原子在氧合作用中移入卟啉平面中 (57) 铁原子的运动通过邻接组氨酸传递到其它亚基 (57) 氧协作结合的机理 (58) DPG 通过交联脱氧血红蛋白降低氧的亲和性 (59)  $CO_2$  与血红蛋白的末端氨基结合并降低其氧亲和性 (60) 波尔 (Bohr) 效应的机理 (60) 蛋白质分子的内部通讯 (62) 概要 (62) 习题 (63)

### 第5章 分子病: 镰刀形红细胞贫血症

65

镰刀形细胞贫血是一种遗传的慢性溶血性疾病 (66) 脱氧镰刀形血红蛋白的溶解度低得反常 (66) 血红蛋白 S 具有异常的电泳迁移率 (67) 指纹法: 检测镰刀形血红蛋白中改换了的氨基酸 (68)  $\beta$  链中的一个氨基酸被改换 (69) 镰刀形血红蛋白在它表面上有粘斑 (69) 脱氧血红蛋白 S 形成细长的螺旋纤维 (70) 纤维形成速率与脱氧血红蛋白 S 的浓度密切相关 (71) 镰刀形基因的高发生率是由于抗疟的保护作用引起的 (72) 抗镰刀化药物的设计思想 (72) 血红蛋白的分子病理学 (73) 血红蛋白 M: 活性部位突变 (73) 血红素口袋中极性基团阻碍血红素的结合 (74) 某些突变由于改变了三级结构而产生了不稳定的血红蛋白 (74) 变构相互作用在某些亚基界面突变种中受到了损害 (75) 发现突变种血红蛋白所造成的影响 (75) 概要 (75) 习题 (76)

### 第6章 酶的引论

78

酶具有巨大的催化能力 (78) 酶是高度专一的 (78) 有些酶的活性是被调节的 (79) 酶转换能量的形式 (80) 酶并不改变反应的平衡 (81) 酶降低受其催化的反应的活化能 (81) 生成一个酶-底物复合物是酶催化过程的第一步 (81) 活性部位的一些特点 (82) 说明许多酶的动力学性质的米凯利斯-门

顿模型(83)  $V_{\max}$  和  $K_M$  可以通过改变底物浓度来测定(85)  $K_M$  和  $V_{\max}$  值的重要意义(86) 酶催化过程中的动力学完整性:  $k_{cat}/K_M$  判据(87) 酶可以受特定分子抑制(88) 竞争性和非竞争性抑制在动力学上是可以区别的(89) 通过竞争性抑制治疗乙二醇中毒(90) 变构酶并不遵循米凯利斯-门顿动力学(91) 变构相互作用的协同模型(91) 变构相互作用的循序模型(93) 酶-底物复合体中的静电键、氢键和范德瓦耳键(94) 带电的底物能与酶上带相反电荷的基团相结合(94) 底物通过精确定向的氢键与酶结合(94) 蛋白质富有结合氢键的能力(96) 在有立体互补性时范氏相互作用起重要作用(96) 水在生物学上的重要性质是它的极性和内聚性(97) 水减弱了极性相互作用(98) 疏水性相互作用: 非极性基团在水中倾向缔合(98) 概要(99) 习题(100)

## 第7章 酶作用的机制: 溶菌酶和羧肽酶

102

溶菌酶裂解细菌的细胞壁(102) 溶菌酶的三维结构(103) 寻找溶菌酶中的活性部位(105) 竞争性抑制剂结合的方式(106) 从结构到酶的作用机制(106) 正碳离子中间物对催化作用十分关键(109) 实验支持提出的机制(111) 羧肽酶A: 一个含锌的蛋白水解酶(113) 底物的结合在羧肽酶A的活性部位上引起较大的结构变化(114) 电子应变加速了羧肽酶A进行的催化作用(115) 概要(117) 习题(117)

## 第8章 酶原活化: 消化酶和凝块因子

119

糜蛋白酶原通过特定的单一肽键的裂解而被活化(119) 糜蛋白酶的三维结构(120) 糜蛋白酶对芳香族和大块的非极性侧链的专一性(121) 部分底物在催化过程中共价结合到糜蛋白酶上(122) 酰基与酶上一个特别活泼的丝氨酸残基连接起来(123) 通过亲和标记论证组氨酸57的催化作用(124) 电荷接力网络在催化中起着穿梭运输质子的作用(125) 糜蛋白酶包含一个能结合芳香族侧链的深口袋(125) 催化作用形成的短暂四面体中间物(126) 酶原活化的机制(127) 胰蛋白酶和弹性蛋白酶: 同一主题下的差异(128) 胰凝乳蛋白酶抑制剂与胰蛋白酶的活性部位结合得很紧(130) 丝氨酸蛋白酶的趋异进化和趋同进化(130) 胰酶原的激活过程是协调的(131) 酶原的过早激活(如在胰腺炎中那样) 可以是致命的(131) 丝氨酸、锌、硫醇和羧基蛋白酶是蛋白水解酶的几个大家族(131) 一连串酶原激活过程造成凝块(132) 形成凝块需要两种酶途径的交互作用(132) 血纤维蛋白原通过凝血酶转化成血纤维凝块(133) 血纤维蛋白单体自发地形成纤维(133) 血纤维凝块为共价交联所强化(134) 凝血酶是胰蛋白酶的同系物(134) 合成凝血酶原需要维生素K(135) 磷脂表面上的凝血酶原为X<sub>2</sub>因子所活化(136) 血友病和其他出血失控揭示了凝块的最早几步(137) 凝血的内途径(138) 凝血的外途径(138) 控制凝血: 一个挑战性的问题(139) 概要(140) 习题(140)

## 第9章 结缔组织蛋白: 胶原、弹性蛋白和蛋白多糖

142

原胶原是胶原的基本结构单位(142) 胶原具有不寻常的氨基酸组成和顺序(143) 某些脯氨酸和赖氨酸残基被羟基化(143) 糖连在羟基赖氨酸残基上(144) 原胶原是一个三股的螺旋杆(144) 甘氨酸由于小而成为必不可少(146) 胶原螺旋的稳定性取决于协同相互作用(147) 羟化不完全是坏血病中的一个生物化学损伤(148) 溶胶原是胶原的生物合成前体(149) 前体链上增添的肽段是被酶切除的(149) 胶原纤维是互相错开的原胶原分子形成的阵列(150) 溶胶原肽酶控制纤维的生成(151) 胶原纤维通过交联而加固(151) 胶原酶是专一地降解胶原的酶(153) 弹性蛋白是弹性纤维中的橡胶状蛋白质(154) 蛋白多糖形成结缔组织的基础物质(155) 概要(156) 习题(157)

## 第10章 生物膜引论

158

生物膜的共同特征(159) 磷脂是主要的膜脂类(159) 许多膜也含有糖脂和胆固醇(161) 磷脂类和糖脂类容易形成双层(162) 脂类双层是非共价的协同结构(163) 脂类双层对离子和大多数极性分子是高度不通透的(164) 蛋白质实现大多数膜过程(165) 功能性膜系统能从纯化组分中重组(166) 有些膜蛋白深埋在脂类双层中(166) 红细胞膜中含有各种周围蛋白和本体蛋白(168) 负离子通道和血型糖蛋白贯穿红细胞膜(169) 碳水化合物单位定位在质膜的细胞外侧(170) 脂类和许多膜蛋白在膜平面中扩散得很快(171) 膜蛋白并不从双层的一侧转到另一侧(173) 生物膜的流动镶嵌模型(173) 膜是不对称的(173) 膜流动性由脂肪酸组成和胆固醇含量控制(174) 电子显微照片中可以重建膜的三维象(175) 概要(176) 习题(176)

## 第二篇 代谢能量的产生和贮藏

### 第11章 代谢: 基本概念和设计

179

自由能是生物化学中最有用的热力学函数(179)反应的标准自由能变化及其与平衡常数的关系(180)热力学上一个不利的反应可由一有利的反应推动(182)ATP是生物体系中自由能的通用货币(182)ATP不断形成又不断消耗(183)ATP具有较高的基团转移潜势的结构基础(184)ATP的水解使偶联反应的平衡偏移 $10^8$ 倍(185)NADH和FADH<sub>2</sub>是燃料分子氧化作用中主要的电子载体(186)NADPH是还原性生物合成中主要的电子供体(187)辅酶A是酰基的普遍的载体(188)大多数水溶性维生素是辅酶的组分(189)从食物中汲取能量的各个阶段(190)代谢过程是由各种机理所调节的(191)概要(192)习题(193)

### 第12章 糖酵解

194

单糖的命名和构象(195)关键性的结构和反应一览(197)由葡萄糖形成果糖1,6-二磷酸(199)通过裂解和异构化形成甘油醛3-磷酸(201)能量守恒: 磷酸化作用与甘油醛3-磷酸的氧化相偶联(201)由1,3-DPG形成ATP(202)丙酮酸的形成和第二个ATP的产生(202)葡萄糖转变为丙酮酸的能量产量(203)磷酸果糖激酶是控制糖酵解的关键性酶(205)丙酮酸能被转化为乙醇、乳酸和乙酰CoA(206)许多脱氢酶中NAD<sup>+</sup>的结合部位都是非常相似的(207)葡萄糖引起己糖激酶构象发生很大的变化(208)醛缩酶与二羟丙酮磷酸形成希夫碱(209)甘油醛3-磷酸的氧化作用形成硫酯(210)磷酸盐(磷酸盐的类似物)起解联剂的作用(211)烯醇磷酸酯具有高的基团转移潜势(212)氧转运的调节剂——2,3-DPG的代谢(212)红细胞中糖酵解的缺陷会改变氧的转运(214)概要(214)附录: 某些糖的立体化学关系(215)习题(216)

### 第13章 柠檬酸循环

217

由丙酮酸形成乙酰辅酶A(217)柠檬酸循环概貌(217)草酰乙酸与乙酰辅酶A缩合形成柠檬酸(218)柠檬酸异构化为异柠檬酸(218)异柠檬酸被氧化并脱羧形成 $\alpha$ -酮戊二酸(218) $\alpha$ -酮戊二酸的氧化性脱羧形成琥珀酰辅酶A(219)从琥珀酰辅酶A产生一个高能磷酸键(219)琥珀酸的氧化再产生草酰乙酸(220)柠檬酸循环的化学计算(220)丙酮酸脱氢酶复合物: 有组织的酶集合体(222)另一种多酶体系:  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物(226)硫胺素的缺乏引起脚气病(226)对称的分子可能以不对称的方式起反应(227)NAD<sup>+</sup>-脱氢酶使氢发生立体结构上专一的转移(228)致死的合成: 氟乙酸转变为氟柠檬酸(229)柠檬酸循环是生物合成前体的来源(230)丙酮酸脱氢酶复合物的控制(230)柠檬酸循环的控制(231)克雷布斯对于柠檬酸循环的发现(231)概要(232)附录: 手性的RS表示法(233)习题(234)

### 第14章 氧化磷酸化作用

235

氧化磷酸化发生在线粒体中(235)氧化还原电势和自由能的变化(236)呼吸链的范围是1.14伏, 相当于53千卡(237)黄素、铁硫、醌和血红素基团把电子从NADH带到O<sub>2</sub>(238)氧化作用和磷酸化作用由质子梯度偶联起来(241)在三个部位产生质子梯度(242)质子由取向不对称的横穿膜的复合物泵出(243)质子经过一质子通道流回间质即有ATP合成(244)来自细胞质中NADH的电子通过甘油磷酸穿梭而进入线粒体(245)ADP进入线粒体需要ATP出来(246)线粒体含有许多转运离子和代谢物的体系(247)葡萄糖完全氧化产生36个ATP(247)氧化磷酸化的速率决定于对ATP的需要(248)二硝基苯酚使质子梯度消失从而使氧化磷酸化解联(248)细胞色素c的三维结构(249)细胞色素c与其还原酶和氧化酶的相互作用(250)细胞色素c的构象十亿年来基本未变(250)由质子梯度进行动力的传送: 生物力学中的一个中心课题(251)概要(252)习题(252)

### 第15章 戊糖磷酸途径和葡萄糖异生作用

254

戊糖磷酸途径产生NADPH并合成五碳的糖类(254)葡萄糖6-磷酸转变为核酮糖5-磷酸时产生2NADPH(254)核酮糖5-磷酸通过烯二醇中间产物异构化为核糖5-磷酸(255)戊糖磷酸途径和糖酵解由转酮醇酶和转醛醇酶联系起来(255)戊糖磷酸途径的速率由NADP<sup>+</sup>的水平控制(257)葡萄糖6-磷酸的去向决定于对NADPH、核糖5-磷酸和ATP的需要量(258)戊糖磷酸途径在脂肪组织中比



在肌肉中活跃得多(259)转酮醇酶的辅基TPP传递活化的醛类(260)不能与TPP结合的转酮醇酶能引起精神病(261)转醛醇酶以希夫碱的形式携带活化的二羟丙酮(261)葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏引起一种由药物诱发的溶血性贫血(262)谷胱甘肽还原酶通过FAD把电子从NADPH传递给氧化型谷胱甘肽(263)葡萄糖可由非糖的前体合成(264)葡糖异生并非糖酵解的逆转(265)生物素是活化的CO<sub>2</sub>的可移动的载体(266)丙酮酸羧化酶为乙酰CoA所活化(267)草酰乙酸通过穿梭进入细胞溶质并转变为磷酸烯醇式丙酮酸(267)从丙酮酸合成葡萄糖消耗六个高能磷酸键(268)葡糖异生和糖酵解互相调节(268)底物循环放大代谢信号并产生热(268)收缩的肌肉所产生的乳酸被肝脏转变为葡萄糖(269)概要(270)习题(271)

## 第16章 糖原和双糖代谢

272

磷酸化酶催化糖原磷酸解为葡萄糖1-磷酸的作用(273)糖原的分解还需要脱支酶(274)磷酸葡萄糖变位酶把葡萄糖1-磷酸转变为葡萄糖6-磷酸(275)肝脏含有葡萄糖6-磷酸酶——肌肉中没有的水解酶(276)糖原通过不同途径合成和降解(276)UDP-葡萄糖是葡萄糖的一种活化形式(276)糖原合成酶催化葡萄糖从UDP-葡萄糖转移到生长中的链上(277)分枝酶形成 $\alpha$ -1,6键(278)糖原是葡萄糖的非常有效的贮藏形式(278)环AMP是糖原合成和分解的协调控制中心(278)磷酸化酶的活化是由于一个专一的丝氨酸残基被磷酸化(279)糖原磷酸化酶的三维结构(280)磷酸化酶激酶也被磷酸化作用所活化(282)糖原合成酶由于一特殊的丝氨酸残基被磷酸化而失活(282)一套级联反应控制着糖原合成酶和磷酸化酶的磷酸化作用(283)磷酸酶使激酶的调节效应逆转(283)一系列级联反应放大了激素的信号(284)肝脏中的糖原代谢调节血糖水平(284)已知多种由遗传决定的糖原贮藏疾病(285)淀粉是植物的贮藏多糖(286)麦芽糖、蔗糖和乳糖是常见的双糖(286)乳糖的合成由一种修饰性亚基控制(287)大多数成年人不能忍受奶,因为他们缺乏乳糖酶(287)果糖和半乳糖进入糖酵解的入口处(288)假若没有转移酶,半乳糖的毒性就非常高(289)概要(289)习题(290)

## 第17章 脂肪酸代谢

291

脂肪酸的命名(291)脂肪酸的链长和不饱和程度都不同(291)三酰基甘油类是高度密集的能量贮库(292)三酰基甘油被环AMP所调节的脂肪酶水解(293)脂肪酸通过相继除去二碳单位而降解(293)被氧化前脂肪酸先与辅酶A联结(294)肉碱携带活化的长链脂肪酸进入线粒体间质(295)脂肪酸氧化的每一轮都产生乙酰CoA, NADH和FADH<sub>2</sub>(296)软脂酸的完全氧化产生129个ATP(298)不饱和脂肪酸的氧化需要异构酶和差向异构酶(298)最后的硫解一步中奇数链脂肪酸产生丙酰辅酶A(299)假若脂肪分解占优势就由乙酰CoA形成酮体(299)乙酰乙酸是某些组织中的主要燃料(300)动物不能将脂肪酸转变为葡萄糖(301)脂肪酸通过不同途径合成和降解(301)丙二酰辅酶A的形成是脂肪酸合成的关键步骤(301)脂肪酸合成的中间产物都连在一个ACP上(303)脂肪酸合成中的延长循环(304)脂肪酸合成的化学计算(305)真核生物体内脂肪酸是由一多酶复合物合成的(306)柠檬酸将乙酰基从线粒体带到细胞溶质中以用于脂肪酸的合成(307)脂肪酸合成所用NADPH的来源(307)辅助的酶体系实现脂肪酸的延长和去饱和化(308)脂肪酸合成的控制(308)概要(308)习题(309)

## 第18章 氨基酸降解和脲循环

311

$\alpha$ -氨基通过谷氨酸的氧化性脱氨而转变成铵离子(311)转氨酶的辅基吡哆醛磷酸形成希夫碱型中间产物(312)丝氨酸和苏氨酸能直接脱氨(314)大多数陆生脊椎动物体内NH<sub>4</sub><sup>+</sup>转变为脲并排出体外(314)脲循环与柠檬酸循环相连(316)遗传性的脲循环酶的缺陷引起高氨血(316)已降解的氨基酸中碳原子的命运(317)C<sub>3</sub>族: 丙氨酸、丝氨酸和半胱氨酸转变为丙酮酸(317)C<sub>4</sub>族: 天冬氨酸和天冬酰胺转变为草酰乙酸(318)C<sub>5</sub>族: 几种氨基酸通过谷氨酸转变为 $\alpha$ -酮戊二酸(318)琥珀酰辅酶A是某些氨基酸的入口处(319)钴胺素(维生素B<sub>12</sub>)酶催化重排反应和甲基化反应(320)在恶性贫血中钴胺素的吸收受阻(322)已知几种甲基丙二酰辅酶A代谢的遗传性缺陷(322)亮氨酸降解为乙酰CoA和乙酰乙酰CoA(322)苯丙氨酸和酪氨酸被加氧酶降解为乙酰乙酸和延胡索酸(324)加罗德关于代谢的先天气缺陷的发现(325)苯丙氨酸羟化化作用的阻断导致严重的智力发展迟滞(325)概要(326)习题(327)

## 第19章 光合作用

329



光合作用基本方程式的发现(329)叶绿素是接受光的分子(331)光合作用的原初过程发生在一有高度组织的膜系统中(331)光合单位:光子汇集到作用中心内(332)光合作用中所放出的氧来自水(333)希尔反应:照光的叶绿体释放氧并还原人工的电子受体(333)光合作用需要两种光系统的相互作用(334)两个光系统的作用(334)光系统I通过还原态的铁氧还蛋白而产生NADPH(335)光系统II产生一分解水的强氧化剂(336)电子从光系统II流向光系统I时形成质子梯度(336)通过光系统I的循环电子流也能形成ATP(337)跨过类囊体膜的质子梯度推动ATP的合成(338)用放射性标记法阐明碳的途径(339)CO<sub>2</sub>与核酮糖二磷酸反应形成两个磷酸甘油酸(339)果糖6-磷酸的形成和核酮糖1,5-二磷酸的再生(340)三个ATP和两个NADPH使CO<sub>2</sub>到达六碳糖的水平(341)卡尔文循环的调节(342)热带植物有C<sub>4</sub>途径,它由于浓缩CO<sub>2</sub>而加速光合作用(342)乙醇酸是光呼吸的主要底物(343)盐细菌的紫膜蛋白泵入质子以合成ATP(344)概要(345)习题(346)

### 第三篇 大分子前体的生物合成

#### 第20章 膜脂和甾类激素的生物合成

349

磷脂酸是磷酸甘油酯合成和三酰基甘油合成的中间产物(349)CDP-二酰基甘油是磷酸甘油酯从头合成中的活化中间产物(350)磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱可以从磷脂酰丝氨酸形成(351)磷酸甘油酯也可以通过补救途径来合成(351)已经分离了若干专一性的磷脂酶(352)鞘脂类的基本结构单元神经酰胺的合成(352)神经节苷脂是富含糖类的含酸性糖的鞘脂(353)泰-萨二氏症:一种遗传性的神经节苷脂分解失调症(353)胆固醇是从乙酰辅酶A合成的(354)甲羟戊酸和鲨烯是胆固醇合成的中间产物(355)异戊烯焦磷酸——胆固醇形成过程中的一个活化中间产物——的合成(356)从异戊烯焦磷酸合成鲨烯(357)环氧鲨烯环化成羊毛甾醇,羊毛甾醇再转化为胆固醇(358)从胆固醇演变出来的胆汁盐促进脂类的消化(359)肝脏中合成胆固醇的作用受食物中胆固醇的抑制(360)胆固醇和其它脂类都由一系列的脂蛋白运往特殊的靶(360)低密度脂蛋白受体在控制胆固醇代谢方面起关键性作用(360)缺少LDL受体引起高胆固醇血症和过早发生的动脉粥样硬化(362)甾类的命名法(362)甾类激素是由胆固醇演化而来的(363)甾类由利用NADPH和O<sub>2</sub>的单加氧酶羟化(364)孕烯醇酮通过胆固醇的侧链裂解作用而形成(364)黄体酮和类皮质激素的合成(365)雄激素和雌激素的合成(365)21-羟化酶缺乏症引起男性化和肾上腺增大(366)维生素D通过光的作用从胆固醇演变而来(367)五-碳单元可以相互连接,形成多种生物分子(368)概要(369)习题(370)

#### 第21章 氨基酸和血红素的生物合成

372

微生物利用ATP和一种强还原剂把N<sub>2</sub>转变为NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(372)NH<sub>4</sub><sup>+</sup>经由谷氨酸和谷酰胺被同化进入氨基酸(373)氨基酸是从柠檬酸循环和其它主要代谢中间产物合成的(374)谷氨酸是谷酰胺和脯氨酸的前体(376)丝氨酸由3-磷酸甘油酸合成(376)四氢叶酸携带处于不同氧化水平的活化一碳单位(377)S-腺苷甲硫氨酸是甲基的主要供体(379)半胱氨酸是从丝氨酸和高半胱氨酸合成的(380)莽草酸和分支酸是芳香氨基酸生物合成的中间产物(381)组氨酸是从ATP,PRPP和谷酰胺合成的(383)氨基酸的生物合成受反馈抑制的调节(384)谷酰胺合成酶的活力受腺苷酰化作用的调整(386)氨基酸是多种生物分子的前体(388)卟啉是从甘氨酸和琥珀酰辅酶A合成的(389)在某些遗传性的卟啉代谢紊乱症中有卟啉积累(391)胆绿素和胆红素是血红素分解的中间产物(392)概要(392)习题(393)

#### 第22章 核苷酸的生物合成

394

碱基、核苷和核苷酸的命名法(394)嘌呤环是从氨基酸、四氢叶酸衍生物和CO<sub>2</sub>合成的(396)PRPP是核苷酸中核糖磷酸部分的供体(396)嘌呤环在组装过程中与核糖磷酸相连接(397)AMP和GMP是从IMP形成的(398)嘌呤碱基可以通过利用PRPP的补救反应再循环(399)AMP和GMP是嘌呤核苷酸生物合成的反馈抑制剂(400)嘧啶环是由氨甲酰磷酸和天冬氨酸合成的(401)乳清酸从PRPP获得核糖磷酸部分(401)一条单一多肽链含有嘧啶生物合成的前三种酶(402)核苷一磷酸、二磷酸和三磷酸可以相互转变(402)UTP经胺化作用形成CTP(403)嘧啶核苷酸生物合成受反馈抑制作用的调节(403)天冬氨酸转氨甲酰酶由可被分开的催化亚基和调节亚基组成(404)脱氧核苷酸由核糖核苷二磷酸经还原作用而合成(405)脱氧胸苷酸由脱氧尿苷酸经甲基化作用而形成(407)几种抗癌药物封闭

脱氧胸苷酸的合成(408) ATP是 $\text{NAD}^+$ , FAD和辅酶A的前体(409)在人体内嘌呤降解成尿酸(411)在某些生物体内尿酸进一步降解(411)鸟类和陆生爬虫分泌尿酸而不分泌尿素,以便保存水(412)嘧啶的降解(412)尿酸形成过多是痛风的起因(413)莱-纳二氏综合症:自残、智力迟钝和形成过量的尿酸(414)概要(415)习题(416)

## 第23章 代谢的整合

417

代谢的战略:扼要重述(417)代谢调节中重复出现的基本图案(419)主要的代谢途径和控制部位(420)关键性的交叉点:葡糖6-磷酸、丙酮酸和乙酰CoA(422)主要器官的代谢轮廓(423)燃料代谢的激素调节剂(426)血液葡萄糖的水平由肝缓冲(427)长期饥饿下的代谢性适应使蛋白质降解减到最少(428)大量存贮的脂肪使鸟能长距离飞行(429)概要(430)

## 第四篇 信息:遗传信息的储存、传送及表达

## 第24章 DNA:遗传作用、结构和复制

433

DNA的共价结构和命名(433)肺炎球菌被DNA转化的事实揭示了基因是由DNA组成的(434)某些病毒的基因是由RNA构成的(437)沃森-克里克的DNA双螺旋(437)DNA复制中互补链互为对方的模板(439)DNA复制是半保留复制(440)若干病毒在其生命周期的一部分中出现单链DNA(442)DNA是很长的分子(442)双螺旋能进行可逆性解链(443)某些DNA分子是环状的(444)环状双螺旋DNA分子可形成超缠绕(444)DNA聚合酶的发现(446)DNA聚合酶接受来自模板的指令(447)DNA聚合酶I改正DNA中的错误(448)DNA连接酶连接DNA片段(449)DNA聚合酶II和聚合酶III的发现(450)亲代DNA解链和新DNA在复制叉上合成(451)DNA复制开始于独特原点并顺序地沿相反方向进行(451)DNA中的一股是间断性合成的(452)DNA合成由RNA引发(453)ATP的水解推动复制叉上的亲代DNA在REP蛋白作用下解链(454)DNA旋转酶将反向超卷曲泵入亲代DNA,从而促进解链(455)复制机构的复杂性可能是保证高度准确性所必需(455)DNA的损伤不断得到修复(456)DNA修复作用的缺陷导致着色性干皮病及皮肤癌(457)含胸腺嘧啶而非尿嘧啶的DNA能进行脱氨基嘧啶的修复(458)限制性核酸内切酶使DNA的分析革命化(459)特异化学裂解法能快速测定DNA顺序(460)采用酶复制技术测定 $\phi\text{X174}$  DNA的全部碱基顺序(462)概要(462)习题(463)

## 第25章 信使RNA与转录

465

RNA的结构(465)细胞含有三种RNA:核糖体RNA、转移RNA及信使RNA(466)信使RNA概念的提出(466)蛋白质合成的信息中间物——信使RNA的实验证据(467)杂交试验说明信使RNA与其DNA模板互补(468)核糖体RNA与转移RNA也在DNA模板上合成(469)所有细胞内RNA皆由RNA聚合酶合成(469)RNA聚合酶接受DNA模板信息(470)在基因组特定区域内一般仅有一股DNA被转录(471)大肠杆菌的RNA聚合酶由亚基组成(472)在DNA模板的启动子上开始转录(472) $\sigma$ 亚基使RNA聚合酶识别起动位点(473)RNA链以pppG或pppA开始(474)RNA链的合成沿5'→3'方向进行(474)DNA模板含有转录的终止信号(475)rho蛋白参与转录的终止作用(476)许多RNA分子在转录后被裂解及化学修饰(476)转录的抗菌素抑制物:利福霉素及放线菌素(478)已建立起强有力的RNA顺序测定方法(480)概要(481)习题(481)

## 第26章 遗传密码和基因-蛋白质间的关系

483

转移RNA是蛋白质合成中的接合器分子(483)氨基酸由一个从固定点开始的三碱基组编码(484)遗传密码的译解:用人工合成的RNA作信使(485)利用各种共聚体为模板为许多氨基酸测出了密码子的碱基组成(486)三核苷酸促进特异的转移RNA分子和核糖体的结合(487)有确定顺序的共聚体也是破译密码的工具(488)遗传密码的主要特征(491)蛋白质合成的起始信号和终止信号(492)遗传密码的通用性(492)基因中碱基的顺序及其多肽产物中氨基酸的顺序具有线性对应性(共线性)(493)一些病毒DNA序列可编码几种蛋白质(494)真核细胞基因由翻译的和未翻译的DNA顺序镶嵌组成(494)突变是由于DNA上碱基顺序的变动而产生的(496)一些化学诱变剂是相当特异的(497)通过对细菌的诱变作用检出多种潜在的致癌物质(497)概要(498)习题(499)

氨基酸由特异的合成酶活化并连接到转移RNA上(500)蛋白质合成的忠实性依赖 氨基酸-tRNA合成酶的高度特异性(502)转移RNA分子具有统一的设计(503)转移RNA呈L形(504)密码子由反密码子而不是由活化氨基酸进行识别(505)由于摆动使一种转移RNA分子可以识别几种密码子(506)突变型转移RNA分子可抑制其它突变(508)核糖体是蛋白质合成的细胞器,它由大亚基和小亚基组成(509)核糖体能由其组成的蛋白质和RNA分子得到重建(510)蛋白质合成的方向是从氨基到羧基(511)信使RNA翻译的方向是5'→3'(511)数个核糖体同时翻译一个信使RNA分子(512)细菌蛋白质的合成由甲酰甲硫氨酸转移RNA起始(512)起始信号是AUG(或GUG),在其前有数个能与16SRNA配对的碱基(513)70S起始复合物的形成使甲酰甲硫氨酸tRNA进入P位(514)延长因子Tu把氨基酸-tRNA提到核糖体的A位上(514)肽键生成后随即发生移位(515)释放因子使蛋白质合成终止(516)许多蛋白质在翻译后再经修饰(516)链霉素抑制起始过程和造成错读信使RNA(517)嘌呤霉素模拟氨基酸-转移RNA导致链合成的过早终止(517)有些短肽不是由核糖体合成的(518)概要(520)习题(520)

## 第28章 基因表达的调控

$\beta$ 半乳糖苷酶是一诱导酶(522)调节基因的发现(523)操纵子是基因表达的协调单位(523)*lac*阻遏物是四聚体蛋白质(524)*lac*操纵基因具对称性碱基顺序(525)环AMP刺激若干诱导性分解代谢操纵子的转录(525)不同形式的同一蛋白质能活化和抑制阿拉伯糖操纵子的转录(526)色氨酸操纵子的转录同时受到操纵基因及衰减基因的控制(527)衰减作用由领先mRNA的翻译所介导(528)组氨酸操纵子的衰减基因位点含有相连的7个组氨酸密码子(529)阻遏物和激活剂主宰温和噬菌体的发育(529) $\lambda$ 中的两个操纵基因皆含一系列阻遏物结合位点(531) $\lambda$ 阻遏物调节其自身合成(531)概要(532)习题(533)

## 第29章 真核生物染色体和基因表达

一个真核染色体含有一个双螺旋DNA分子(534)真核细胞DNA与称为组蛋白的碱性蛋白质紧密结合(535)所有植物及动物中的组蛋白H3和H4的氨基酸顺序几乎相同(535)核小体是染色质的重复单位(536)核小体核心由绕在组蛋白八聚体上含140个碱基对的DNA构成(537)核小体是DNA紧缩的第一阶段(538)真核细胞DNA的复制是多起点的双向复制(540)新组蛋白在随从子代DNA双螺旋上生成新核小体(541)线粒体和叶绿体含有其自身DNA(541)真核DNA含有许多重复碱基序列(542)高度重复性DNA(卫星DNA)集中在着丝点(543)核糖体RNA的基因有前后几百次重复(544)组蛋白的基因是密集的并有前后多次重复(546)许多主要蛋白质由单拷贝基因编码(547)多数单拷贝基因由重复性顺序隔开(547)高等真核生物中为蛋白质编码的基因几乎全是分隔的(548)真核细胞中的RNA由三类RNA聚合酶合成(548)蘑菇毒素—— $\alpha$ 鹅膏蕈碱是RNA聚合酶II的高效抑制剂(549)特异基因在转录时活化(549)单一初级转录本加工后形成三种核糖体RNA(550)信使RNA由巨大的核RNA前体(hnRNA)选择性地产生(551)真核mRNA带有5'端帽,并常见3'多聚A尾(551)拼接酶高度准确地从分隔基因的初级转录本中除去内含子(552)现已知道若干信使RNA的碱基顺序(553)真核细胞核糖体(80S)由一个小亚基(40S)及一个大亚基(60S)组成(554)地中海贫血是血红蛋白合成的遗传性缺陷(554)翻译过程由一个使起始因子失活的蛋白激酶级联反应所调控(555)白喉毒素抑制移位作用,从而阻断真核细胞的蛋白质合成(556)结合在内质网上的核糖体合成分泌性蛋白质及膜蛋白质(556)信号序列促使分泌性蛋白质跨过内质网膜(557)糖蛋白由内质网中存在的多萜醇供体获得核心糖(559)糖蛋白在高尔基器中被修饰和拣选(560)概要(562)

## 第30章 病毒

小病毒的外壳由许多相同的蛋白质亚基构成(565)烟草花叶病毒(TMV)的自装配(566)在TMV装配中蛋白质盘加到RNA的环上(567)经T4噬菌体感染后大肠杆菌的大分子合成受到深刻改变(568)支架蛋白质及蛋白酶参与T4噬菌体的有序装配(570)T4DNA通过不等长对应体中间物的生成得到复制(570)T4DNA插入到预制的头部(571)TBSV外壳蛋白的柔性使它形成二十面体壳(572)细菌限制性核酸内切酶使外来DNA分子裂解(573)RNA病毒复制的战略(574)脊髓灰质炎

病毒蛋白质由巨大前体通过多点裂解形成(574)滤泡性口炎病毒(VSV)依其RNA基因组转录形成五个单顺反子mRNA(575)呼肠孤病毒的基因组由十个不同的双链RNA分子组成(576)小RNA噬菌体含有交搭基因(577)噬菌体RNA在细胞外的达尔文式进化(578)溶原噬菌体能将其DNA插入宿主细胞DNA中(578)反转病毒及若干DNA病毒可在易感宿主中诱发肿瘤(579)SV40和多瘤病毒生产性地感染或转化宿主细胞(581)反转病毒含有从(+)RNA合成双螺旋DNA的反转录酶(582)反转病毒DNA只在整合进入宿主基因组时才得到转录(583)鸟类肉瘤病毒src基因编码的激酶是转化作用的介导物(584)双链RNA抑制经干扰素处理的细胞中的蛋白质合成(585)概要(586)

### 第31章 基因重排: 重组、移位和克隆

588

基因重组经过DNA链的断裂及连接(588)基因重组时同源DNA链配对形成双链的中间物(589)基因重组时recA蛋白催化ATP驱动的DNA链的交换(590)细菌含有质粒及其他流动性遗传元件(591)F因子通过接合作用使细菌将基因供给受体(592)R因子质粒使细菌对抗生素具抗性(593)插入元件能使无关基因连接(594)实验室中可建造新的基因组并在宿主细胞中克隆化(595)限制性酶及DNA连接酶是形成重组DNA分子的必需工具(596)质粒及λ噬菌体是在细菌中克隆DNA的上选载体(597)从基因组DNA的消化液开始克隆真核细胞的特定基因(598)真核细胞基因可在细菌的细胞中被转录及翻译(599)一种化学合成的生长激素释放抑制因子(一种肽类激素)基因在大肠杆菌中得到表达(599)基因克隆所产生的冲击(600)概要(600)

## 第五篇 分子生理学

### 第32章 细菌细胞被膜

603

细胞壁是一个巨大的袋状大分子(603)肽聚糖合成的步骤(604)UDP-糖-肽单位的合成(605)糖-肽单位向载体脂的转移(605)接在载体脂上的二糖-肽单位的合成(606)二糖-肽单位向生长着的多糖链转移(606)转肽作用使多糖链交联(607)革兰氏阳性细菌的肽聚糖上覆盖着磷壁酸质(607)青霉素抑制细胞壁的合成而使生长中的细菌死亡(608)青霉素抑制转肽作用使细胞壁的合成受阻(609)有些细菌对青霉素有抗性,因为它们能合成一种破坏青霉素的酶(610)富含脂多糖的外膜包裹着革兰氏阴性细菌(610)O侧链的多样性有助于革兰氏阴性细菌避开宿主的防卫(612)孔蛋白形成通道,使小的极性分子得以穿过外膜(612)新生的外膜蛋白含有将被切除的信号顺序(613)概要(614)

### 第33章 免疫球蛋白

615

基本定义(615)抗原引起的特异抗体的合成(616)抗体的结合部位与酶的活性部位相似(617)给定特异性的抗体制剂通常是不均一的(617)免疫球蛋白G可被酶解成活性片段(618)免疫球蛋白G由L链和H链组成(619)免疫球蛋白G是一个柔性的Y形分子(619)抗体是通过选择还是通过指令形成的?(619)指令理论的让位(620)骨髓瘤和杂种瘤免疫球蛋白是均一的(620)每个L链和H链均由一个可变区和一个不变区组成(621)L链和H链的超变区组成抗原结合部位(622)可变区和不变区具有不同的作用(623)抗体分子折叠成若干个具有同源顺序的密实结构域(623)抗体结合部位的x射线分析揭示出一些半抗原是如何结合的(625)不同类的免疫球蛋白各自具有独特的生物活性(625)基因的重复和分化使抗体分子进化(626)可变区和不变区由连接起来的独立基因编码(626)多种多样的抗体特异性是怎样产生的?(627)有数百种L链和H链的可变区基因(628)J(连接)基因的发现,抗体多样性的另一个来源(628)在V基因与J基因的连接上选择不同框架也有助于多样性(629)初转录本经拼接后形成L链和H链的mRNA(629)通过V<sub>H</sub>基因的跳跃形成不同类别的抗体(630)许多胚系基因的体细胞重组和体细胞突变产生多样性(631)抗体形成的克隆选择理论(632)抗体生成细胞的表面含有抗原的受体(632)克隆选择的生物学意义(633)概要(633)

### 第34章 肌肉收缩和细胞游动性

635

肌肉由相互作用的粗蛋白丝和细蛋白丝组成(635)肌肉收缩时粗丝和细丝相对滑动(637)肌球蛋白形成粗丝、水解ATP并与肌动蛋白结合(637)肌球蛋白能被裂解成活性片段(638)肌动蛋白形成能与肌球蛋白结合的丝(638)肌动蛋白提高肌球蛋白的ATP酶活性(639)粗丝和细丝具有方向性(639)粗丝和细丝的极性在肌小节的中部反向(640)作功冲程来自与肌动蛋白复合的肌球蛋白S1头部的偏转

(641)肌钙蛋白和原肌球蛋白介导钙离子调节肌肉收缩(642)肌质网控制钙离子流(643)磷酸肌酸是~P的贮存库(643)几乎所有的真核细胞中肌动蛋白和肌球蛋白均具有收缩作用(644)微丝在细胞中的分布可用免疫荧光显微镜技术显示(645)泊靠在膜上的肌动蛋白丝介导肠微绒毛的收缩(646)细胞松弛素和鬼笔环肽抑制需肌动蛋白丝反转的运动(647)微管参与细胞运动并组成细胞骨架的一部分(648)动蛋白诱导的微管滑动造成纤毛和鞭毛的搏动(649)概要(650)

### 第35章 激素作用

652

多种激素的作用介质——环AMP的发现(653)环AMP由腺苷酸环化酶合成而被磷酸二酯酶降解(654)环AMP是多种激素作用的第二信使(655)鸟嘌呤核苷酸结合蛋白使激素受体与腺苷酸环化酶偶联(656)环AMP激活蛋白质激酶(657)环AMP是一个古老的饥饿信号(657)霍乱毒素通过抑制G蛋白的GTP酶活性而激活腺苷酸环化酶(658)胰岛素促进合成过程和抑制分解过程(659)前胰岛素原和胰岛素原是活性激素的前体(659)胰岛素的三维结构(661)胰岛素受体位于靶细胞的质膜中(662)胰岛素的不足引起糖尿病(663)内啡肽是起类似鸦片剂作用的脑肽(664)鸦片皮质素原裂解产生几个肽激素(665)前列腺素是激素作用的调节剂(665)前列腺素是从不饱和脂肪酸合成的(666)类固醇激素激活特定的基因(667)生长因子蛋白质(如NGF和EGF)促进靶细胞增殖(667)概要(669)

### 第36章 膜运输

670

被动运输和主动运输的区分(671)钠和钾离子主动运输系统的发现(672)酶和泵在膜中都是定向的(672)ATP短暂性地将钠-钾泵磷酸化(673)离子的运输和ATP的水解紧密偶联(674)钠-钾泵是寡聚跨膜蛋白质(674)钠-钾泵机制的一个模型(674)强心类固醇是钠-钾ATP酶和泵的专一抑制剂(675)钙由不同的ATP酶运输(676) $\text{Na}^+$ 的流动推动了糖和氨基酸主动运输进入动物细胞(677)质子的流动推动许多细菌的运输过程(678)一些糖的主动运输与他们的磷酸化作用相偶联(678)运输抗菌素提高膜的离子通透性(680)运输抗菌素是载体或通道形成体(681)在环状炸饼形载体抗菌素中心腔中结合离子(682)缬氨霉素结合 $\text{K}^+$ 比结合 $\text{Na}^+$ 强一千倍(683)穿过膜中单一通道的离子流动可被检测(684)间隙接头允许离子和小分子在通讯细胞间流动(685)概要(686)

### 第37章 可兴奋膜和感觉系统

688

动作电势由 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 通透性的暂时变化所介导(688)河豚毒素和蛤蚌毒素阻塞神经轴突膜中的钠通道(690)乙酰胆碱是神经传递介质(691)乙酰胆碱打开突触后膜中的阳离子门(691)乙酰胆碱以小包装形式被释放(692)重建的膜泡加入乙酰胆碱时成为阳离子可通透性膜(692)乙酰胆碱的迅速水解和终板重极化(694)乙酰胆碱酯酶的抑制剂可用作药物和毒物(694)为有机磷中毒设计的一个解毒药(695)乙酰胆碱受体的抑制剂(697)儿茶酚胺和 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)也是神经传递介质(698)单个光子能激发视网膜的视杆细胞(699)视紫红质是视杆细胞的光感受蛋白(700)光使11-顺视黄醛异构化(701)光使外段的质膜超极化(702)传递介质将信号从光解的视紫红质传送到质膜(703)光激活磷酸二酯酶从而降低环GMP的水平(704)色视觉由三种光受体介导(705)所有已知视觉系统中的生色团都是11-顺视黄醛(706)细菌的化学感受器探测特定的分子并将信号送至鞭毛(706)鞭毛底部的可逆运动肌使细菌的鞭毛转动(707)细菌察觉瞬时而不是瞬息空间的梯度(708)在细菌的趋化性中信息通过甲基化的蛋白质流动(708)概要(709)

## 第六篇 第三版新增内容

### 译者说明

712

### 第1章 前言

715

本书的设计(715)

### 第2章 蛋白质结构和功能

717

蛋白质结构的不同水平(717)根据氨基酸顺序预测构象(717)蛋白质作用的实质:专一的结合和构象变化的传递(719)

### 第3章 蛋白质研究法

721

蛋白质可用凝胶电泳法分离并显示出来(721)超速离心法在分离生物分子和测定其分子量方面是重要



的 (722) 重组 DNA 技术使蛋白质顺序的测定发生了根本变革 (724) 氨基酸顺序说明许多问题 (724)	
X 射线结晶学在原子细节上揭示三维结构 (725) 可用高度专一的抗体对蛋白质定量和定位 (725) 用自动化固相法可以合成肽 (727)	
<b>第4章 DNA 和 RNA: 遗传的分子</b>	729
有些病毒在其生活史中某一阶段有单链 DNA (729) 某些病毒的基因是由 RNA 组成的 (729) RNA 肿瘤病毒通过双螺旋的 DNA 中间体而复制 (730)	
<b>第5章 遗传信息流</b>	731
许多真核基因是内含子和外显子的镶嵌物 (731) 许多外显子编码蛋白质结构域 (731) 在进化过程中 RNA 可能出现在 DNA 和蛋白质之前 (732)	
<b>第6章 基因研究技术: DNA 的分析、组建和克隆</b>	733
可用凝胶电泳将限制性酶切片段分开并观察 (733) 限制性酶切片段长度的多型性 (RFLP) (734) 可用有控制地干扰复制的方法 (桑格双脱氧法) 测定 DNA 的顺序 (734) 用自动化的固相方法可合成 DNA 探针和基因 (735) 新的基因组可被重组、克隆和表达 (735) 限制性酶和 DNA 连接酶是重组 DNA 分子的关键性工具 (736) 质粒和 $\lambda$ 噬菌体被选作在细菌中克隆 DNA 的载体 (737) 从酶解的基因组 DNA 中可克隆到特殊的基因 (738) 从 mRNA 制备的互补 DNA (cDNA) 可以在宿主细胞中表达 (740) 插入真核细胞的新基因可以高效表达 (741) 用诱导瘤的 (Ti) 质粒携带新基因进入植物细胞 (743) 用定点突变基因工程产生新蛋白质 (744) 重组 DNA 技术开辟了广阔的远景 (745) 概要 (746)	
<b>第7章 转运氧的蛋白质: 肌红蛋白和血红蛋白</b>	747
肌红蛋白的中央外显子编码功能性血红素结合单位 (747) 血红蛋白由 4 个多肽链组成 (747) 胎儿的 DNA 可用以分析镰刀型细胞基因的存在 (748)	
<b>第9章 酶作用的机理</b>	749
核糖核酸酶 A 水解 RNA 时形成环式磷酸中间物 (749) RNA 水解的过渡状态中磷是五共价的 (750) RNA 分子也可能是效力很高的酶 (751) 羧肽酶 A 的催化机理 (752) 定位突变是设计并制造新的酶以及阐明其机理的有效方法 (753) 对过渡状态专一的抗体有催化活性 (753) 概要 (754)	
<b>第10章 酶活性的控制</b>	756
ATC 酶及其与双底物类似物 PALA 的复合物的三维结构 (756) ATC 酶中变构的相互作用是由四级结构中大的变化而转达的 (757) 底物结合在 ATC 酶上引起高度协同的变构转变 (758) $\alpha_1$ 抗胰蛋白酶的不足引起肺气肿 (758) 用重组 DNA 技术产生的抗血友病因子有疗效 (759) 凝血酶可逆地被抗凝血酶 III 所抑制 (759) 血纤维蛋白凝块为血纤维蛋白溶酶所溶化 (760)	
<b>第11章 结缔组织蛋白</b>	761
胶原的基本结构单位由三种链组成 (761) 甘氨酸是关键性的, 因为它小 (761) 粘连蛋白, 一种细胞表面的蛋白质, 使得细胞能与胞外基质相互作用 (761) 概要 (763)	
<b>第12章 生物膜引论</b>	764
功能膜系统可用提纯的组分重组 (764) 红细胞膜含有各种外周蛋白和内插蛋白 (765) 跨膜的蛋白质血型糖蛋白在红细胞周围形成一碳水化物的外壳 (766) 根据氨基酸顺序可以准确地预测跨膜螺旋 (767) 从几种跨膜的 $\alpha$ 螺旋形成阴离子通道 (768) 红膜肽形成一膜骨架, 从而使红血球能耐受强的切变力 (769) 结晶的膜蛋白的电镜和 X 射线分析非常解决问题 (770)	
<b>第13章 代谢: 基本概念和设计</b>	771
核磁共振波谱法能揭示完整生物体内的代谢事件 (771)	
<b>第15章 糖酵解</b>	773
由裂解和异构化形成甘油醛 3 磷酸 (773) 果糖和半乳糖进入糖酵解 (773) 若无转移酶, 半乳糖就是毒性很大的 (774) 磷酸果糖激酶是控制糖酵解的关键性酶 (774) 己糖激酶和丙酮酸激酶也参与糖酵解步伐的调节 (775) 磷酸甘油酸通过一种与酶结合的 2, 3 BPG 中间物而发生相互转变 (776)	
<b>第16章 柠檬酸循环</b>	777
柠檬酸异构化为异柠檬酸 (777) 柠檬酸合酶在与草酰乙酸结合时发生大的构象变化 (777) 乙醛酸循	

环使得植物和细菌能利用乙酸盐而生长 (778) 柠檬酸循环能量产率高, 所以在进化中被选中 (779)	
<b>第17章 氧化磷酸化</b>	781
呼吸链由三种酶复合物组成, 其间由两种可移动的电子载体连接起来 (781) 电子从还原型泛醌经过细胞色素还原酶流向细胞色素c (781) 细胞色素氧化酶催化电子从细胞色素c到O <sub>2</sub> 的传递 (782) ATP是由一酶复合物合成的, 此复合物由传递质子的单位F <sub>0</sub> 和催化单位F <sub>1</sub> 组成 (783) 通过ATP合酶的质子流使牢固结合的ATP被释放 (783) O <sub>2</sub> 的有毒衍生物 (如超氧化物自由基) 为保护性酶所清除 (785)	
<b>第18章 戊糖磷酸途径和葡萄糖异生作用</b>	787
葡萄糖异生作用和糖酵解是相互调节的 (787)	
<b>第19章 糖原代谢</b>	788
吡哆醛磷酸参与糖原的磷酸解作用 (788) 已知许多种由遗传决定的糖原贮存疾病 (788)	
<b>第20章 脂肪酸代谢</b>	789
肉毒碱将长链的活化的脂肪酸带入线粒体衬质 (789) 真核生物中脂肪酸由多功能的酶复合物合成 (789) ACP的形状易变的磷酸泛酰巯基乙胺单位将底物从一个活性部位运载至另一活性部位 (789) 脂肪酸的延长和不饱和化由辅助性酶系统进行 (790) 脂肪酸代谢的控制 (791)	
<b>第21章 氨基酸的降解和脲循环</b>	792
当底物形成希夫碱连结时, 天冬氨酸转氨酶的活性部位的裂缝关闭 (792) 吡哆醛磷酸是变化多端的辅酶, 它催化氨基酸的许多反应 (793) 辅酶B <sub>12</sub> 提供自由基, 以催化与氢有关的分子内的迁移 (793)	
<b>第22章 光合作用</b>	795
光系统II把电子从水传递至质体醌 (795) 在从水中汲取电子给O <sub>2</sub> 方面, 锰离子起关键作用 (796) 叶绿体的ATP合酶与细菌和线粒体的类似 (797) 光系统I和ATP合酶位于非垛叠的类囊体膜中 (798) 在蓝细菌和红藻中藻胆素体起分子光管的作用 (799) 一种光合作用中心的结构已在原子水平上被阐明 (799) CO <sub>2</sub> 与核酮糖1,5-二磷酸反应形成二分子3-磷酸甘油酸 (800) 核酮糖1,5-二磷酸羧化酶也催化与之相竞争的加氧酶反应 (801) 在协调光合作用的光反应和暗反应方面, 硫氧还蛋白起作用 (802) 概要 (803)	
<b>第23章 磷脂和固醇激素的生物合成</b>	804
缩醛磷脂和其它醚磷脂是由二羟丙酮磷酸形成的 (804) 胆固醇和其它脂类由脂蛋白转移到专一的靶位 (805) LDL受体是跨膜蛋白质, 有5个不同的功能结构域 (806) 无LDL受体引起高胆固醇血和动脉粥样硬化 (806) HMG CoA还原酶的抑制剂Mevinolin引起LDL受体数目的增多 (807)	
<b>第24章 氨基酸和血红素的生物合成</b>	808
氨基酸是由柠檬酸循环和其它主要途径的中间产物合成的 (808) 谷胱甘肽是γ-谷氨酰肽, 起着巯基缓冲剂和氨基酸转运体的作用 (808) 胆绿素和胆红素是血红素分解的中间产物 (810) 概要 (810)	
<b>第25章 核苷酸的生物合成</b>	812
核糖核苷酸还原酶在其活性部位上含有自由基 (812) 核糖核苷酸还原酶的底物专一性和催化活性是精确控制的 (813) 几种抗癌药物阻断去氧胸苷酸的合成 (813) 尿酸作为强有力的抗氧化剂起着有利作用 (814)	
<b>第26章 代谢作用的整合</b>	815
主要代谢途径和控制部位 (815) 糖尿病的代谢紊乱来源于胰岛素的相对不足和胰高血糖素的相对过量 (815) 葡萄糖与血红蛋白反应形成一种血糖水平的指示剂 (816)	
<b>第27章 DNA的结构、复制和修复</b>	817
DNA的结构是动态的, 并能采取各种各样的形式 (817) 主槽和次槽均衬有对顺序专一的、由氢键连结起来的基团 (818) RNA的2'-OH适合于碱基对倾斜的A-DNA螺旋, 但不适合于B-DNA螺旋 (819) Z-DNA是左手双螺旋, 其主链上的磷酸根呈锯齿形排列 (820) 脱氧核糖核酸酶I (DNA酶I) 通过静电引力与DNA双螺旋的次槽相结合 (822) EcoRI核酸内切酶将其旋转对称的靶子解链, 并形成多个氢键 (823) DNA连接酶将双链区域中DNA的末端连接起来 (824) DNA的连接数是拓扑学的特性, 它决定着超螺旋的程度 (825) 大多数天然存在的DNA分子都是负的超螺旋 (827) 拓扑异构酶I催化超螺旋DNA的松弛 (827) DNA促旋酶催化由ATP推动的向DNA中引入负超	

螺旋的作用(828) DNA聚合酶 I 含有一深裂缝用于与双螺旋 DNA 结合(829)复制从 *oriC* (起点)部位的解链开始(829) DNA聚合酶 III 全酶是加工能力强而又准确的酶,它合成大多数 DNA(830)前导链和后随链是由二聚的 DNA聚合酶 III 在复制叉上合成的(830)

## 第28章 基因重组:重组和易位

833

*recA* 蛋白催化一般重组中由 ATP 推动的 DNA 链的交换(833) *recBCD* 的解螺旋作用和核酸内切酶作用产生了用于重组的单链 DNA(834) DNA 的损伤引发 SOS 反应,此反应是由一种阻遏蛋白的水解发动的(834)易位子是极易移动的遗传因子(835)

## 第29章 RNA 的合成和剪接

838

大肠杆菌的 RNA 聚合酶是由多个亚基组成的酶(838)转录从 DNA 模板上的启动子部位开始(838)热休克基因是由一种特殊的  $\sigma$  亚基识别的(840) RNA 聚合酶在开始 RNA 合成之前先将模板 DNA 螺旋解开将近两转(840)延长在转录鼓泡上进行,鼓泡沿 DNA 模板移动(841)几个 U 残基之后的 RNA 发夹引起转录的终止(841)真核生物中转录和翻译在空间上和时间上是分开的(842)真核细胞中 RNA 是由 3 种 RNA 聚合酶合成的(843)真核的启动子含有 TATA 匣子和另外的上游顺序(843)称为转录因子的特殊的蛋白质与真核的启动子相互作用(844)促进子顺序能在距起始部位数千碱基远处促进转录(845)在转录过程中 mRNA 的前体得到 5' 帽子(846)在被核酸内切酶切开后,3'-多腺苷酸尾被加到大多数 mRNA 上(846) mRNA 前体中的剪接部位是由内含子末端的顺序所专一化的(847)在 mRNA 前体的剪接中形成了套索式中间产物(848)小的核中核糖核蛋白颗粒 (snRNPs) 与 mRNA 前体结合形成剪接体(849)自我剪接的 RNA: 催化性 RNA 的发现(850)剪接体所催化的剪接可能在进化上是由自我剪接演变而来(851)

## 第30章 蛋白质的合成

853

蛋白质合成的准确性依赖于氨酰 tRNA 合成酶的高度专一性(853)过渡状态中  $\gamma$ -磷酸基的结合大大促进了酪氨酰-AMP 的形成(853)多个转移 RNA 分子来自于核糖核酸酶 P 对大的前体的酶切(854)核糖体是核糖核蛋白颗粒 (70S), 由大 (50S)、小 (30S) 两种亚基组成(855)各种核糖体 RNA (5S, 16S 和 23S rRNA) 含有许多碱基配对的螺旋区域 (855)正在用电镜术、中子衍射和交联法作出核糖体构造的图谱(856) EF-Tu 的 GTP 酶速率确定蛋白质合成的步伐,并决定其准确性(856)真核的和原核的蛋白质合成有许多共同的结构和机理上的特点(858)真核生物中的翻译是由蛋白质激酶调节的,它钝化起始因子(859)白喉毒素由于抑制移位而阻断真核细胞中的蛋白质合成(860)

## 第31章 蛋白质的到位

861

胞液中的蛋白质能由于一种信号顺序结合在其氨基末端上而被指令到 ER 去(861)信号识别颗粒 (SRP) 探查信号顺序,并把核糖体带到 ER 膜上(862)转运是由 ATP 推动,并由信号顺序和终止转移的顺序指导的过程(863)转移囊泡将蛋白质从 ER 带到高尔基体中,以便糖基化和分拣(864)甘露糖-6-磷酸是使溶酶体中的酶到达其最终归宿的标志物(866)分泌的和质膜的蛋白质不以糖类的标志物为根据而被送到位(867)蛋白质可被送到质膜的特定区域和分泌性囊泡中(867)细菌也利用信号顺序使蛋白质到位(868)线粒体中的大部分蛋白质是在胞液中合成,再运入此细胞器的(869)通过前顺序的连接,胞液中的蛋白质可再受指令进入线粒体中(869)叶绿体中的大部分蛋白质也是根据其前顺序而被输入和分拣的(870)核定位信号使得蛋白质通过核孔而迅速进入核内(870)特殊的蛋白质通过以受体为媒介的胞吞作用而被运入细胞内(871)笼形蛋白形成一围绕有壳小孔的多面晶格而参与胞吞作用(872)被胞吞的蛋白质和受体在酸性内小体中被分拣(873)许多种病毒和毒素通过以受体为媒介的胞吞作用进入细胞(874)泛素使蛋白质到达被破坏处(876)概要(878)

## 第32章 原核生物中基因表达的控制

880

可诱导的分解代谢的操纵子是由含有结合态环 AMP 的 CAP 蛋白从总体上调节的(880)同一种蛋白质的不同形式活化和抑制阿拉伯糖操纵子的转录(881)  $\lambda$  阻遏蛋白的水解和 *cro* 蛋白的合成终止溶原作用(881)螺旋-转角-螺旋的特点调节着许多种调节蛋白与 DNA 中控制部位的结合(883)改变其识别螺旋,可改变阻遏蛋白的专一性(884)游离的核糖体蛋白阻遏为其编码的 mRNA 的翻译(884) DNA 的倒位导致一对鞭毛基因的另一表达(885)概要(886)



### 第33章 真核的染色体和基因表达

887

真核的染色体含有一个线状的 DNA 双螺旋分子(887)染色体两端(端粒)由添加已形成的整段寡核苷酸而复制(887)线粒体和叶绿体含有其自身的 DNA(888)人的基因组含有差不多一百万个拷贝的极为相似的 ALU 顺序(888)着丝粒含有重复极多的 DNA, 可将它与其它染色体 DNA 分开(888)核糖体 RNA 的基因以纵列方式重复数百次(889)组蛋白基因聚成簇, 并且也纵列地重复多次(889)许多主要的蛋白质是由单拷贝的基因编码的(890)在选择的压力下单拷贝基因可大量扩增(891)两组血红蛋白基因依其在发育过程中的表达顺序而排列(891)哺乳类的基因组中只有一小部分为蛋白质编码(893)染色体中转录上活跃的区域是甲基化不足的和对 DNA 酶 I 超敏感的(893)转录因子 IIIA 含有与金属结合的指状物, 它活化 5S 核糖体 RNA 的基因(894)同源转化匣子是基因中重复出现的特点, 它控制着昆虫和脊椎动物的发育(895)

### 第34章 病毒和致癌基因

897

TBSV 的外壳蛋白的易变性使得它能形成二十面体外壳(897)类病毒是最简单的植物病原物, 是类似内含子的小的环状 RNA(897)脊髓灰质炎病毒蛋白由巨大前体的多次切割形成(897)流感病毒膜中的血球凝集素使得它进入敏感性的细胞(898)呼肠孤病毒的基因组由 10 种不同的双链 RNA 分子组成(899)反病毒中的致癌基因由细胞中正常基因衍生而来(899)获得性免疫缺乏综合症(艾滋病)是由反病毒引起的(901)

### 第35章 分子免疫学

903

其专一性已设计好的单克隆抗体是容易制备的(903)恒定的区域传递效应剂的功能, 如引发补体的级联反应(904)X 射线分析阐明了抗体如何与半抗原和抗原结合(905)J(连接)基因和 D(多样化)基因增加抗体的多样性(905)B 淋巴细胞由于把抗体结合在跨膜的免疫球蛋白上而被活化(906)T 细胞杀死被感染的细胞, 并调谐 B 细胞的作用(907)由两类主要的组织亲和性复合物(MHC)蛋白把抗原提供给 T 细胞(908)T 细胞受体是类似抗体的蛋白质, 含有可变的和不变的区域(909)免疫球蛋白基因的超族编码多种蛋白质, 它们是为细胞与细胞的相互作用搭桥的(911)免疫反应揭示了选择机理的力量(912)概要(912)

### 第36章 肌肉的收缩和细胞的运动

914

动蛋白沿着微管道单方向地推动囊泡和细胞器(914)由 GTP 推动的微管的迅速的组装和拆卸是形态发生中的核心问题(915)概要(917)

### 第37章 膜转运

918

大多数真核细胞中有三类推动离子运动的 ATP 酶(918)细菌视紫红质中视黄醛的光异构化作用在盐细菌中产生质子梯度(919)红细胞的阴离子交换蛋白用氯离子交换重碳酸根(921)概要(921)

### 第38章 激素的作用

923

与鸟嘌呤核苷酸结合的蛋白质(G 蛋白)把激素受体与腺苷酸环化酶偶联起来(923) $\beta$ -肾上腺素受体的七螺旋特点是 G 蛋白级联反应中重复出现的特点(924)一大类 G 蛋白转换许多激素的和感觉的刺激(926)受体引发的磷脂酰肌醇二磷酸的水解产生两种信使(927) $IP_3$  将钙离子释放到细胞液中, 二酰基甘油活化蛋白质激酶 C(928)调钙蛋白属于一大类感钙蛋白, 它含有螺旋-环-螺旋部位(EF 手)(929)钙离子载体、缓冲剂和指示剂是有价值的实验工具(930)类花生酸激素由多烯脂肪酸衍生而来(930)阿司匹灵使环氧合酶乙酰化而抑制前列腺素的合成(931)胰岛素开动其受体的酪氨酸激酶活性(932)

### 第39章 可兴奋膜和感觉系统

934

接受甲基的趋化性蛋白传递向化信号使穿过质膜(934)鞭毛转动的开关以 che 基因所编码的中央加工系统为媒介(935)在脂类双分子层中重建的纯化的钠通道有功能活性(936)钠通道蛋白由 4 个重复的单位组成, 它们跨越膜并形成一小孔(937)乙酰胆碱打开突触后膜中的阳离子大门(937)点接触夹导度测量揭示出单个通道的活性(937)乙酰胆碱受体通道是由 5 个同源的跨膜多肽形成的(939)为乙酰胆碱受体的亚基编码的 mRNA, 经显微注射到爪蟾卵母细胞之中后可以表达(940)甘氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)打开氯离子通道(940)许多信号分子是由一种主要代谢物通过一单个步骤而形成的

(941)视紫红质是一大类有7个跨膜螺旋的受体中的一员(942)光激发的视紫红质引发一级联反应导致高度放大的GMP的水解(943)视黄醛杆细胞的光敏通道以环式GMP的结合为大门(944)颜色视觉以3种光受体细胞为媒介(944)概要(945)

选读文献 (第三版新增部分)	946
选读文献 (第二版)	990
习题答案	1049
附录A 物理常数和单位换算	1057
附录B 元素的原子序数和原子量	1058
附录C 某些酸的 $pK'$ 值	1059
附录D 标准键长	1060
附录E 生物化学中常用略语	1061
索引	1062

## 第1章 分子和生命

生物化学研究生命的分子基础。今天生物化学之所以如此活跃和令人鼓舞，当有几个原因。第一，几个中心过程的化学基础现在已被理解。脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构(图1-1)之被发现，遗传密码之被解明，有些蛋白质分子三维结构之被测定，中心代谢途径之被探明，是生物化学中若干突出的成就。其次，生命的各式各样的表现背后存在着共同的分子模式和原理。生物，差别大到象大肠杆菌和人体，在分子水平上却仍有很多共同特点。它们都是用相同构造单元来构成大分子的。在两个物种中，遗传信息从DNA经核糖核酸(RNA)传到蛋白质，基本上是一样的。两者都用腺苷三磷酸(ATP)作为能量的货币。第三，生物化学对医学正在产生越来越大的作用。例如，测定酶的活性在今天的临床诊断中起着重要作用。血清中某些酶的水平是衡量一个病人近来是否有过心肌梗塞的重要判据。更有进者，生物化学正开始为合理设计药物提供根据。最为重要的是，疾病的分子机制正在被阐明，可以镰刀形细胞贫血和大量已被表征的先天性代谢缺陷为例证。第四，近年来，生物化学之飞速发展已使研究者能探索生物学和医学中一些最有挑战性和最为基本的课题。单个细胞究竟是怎样产生出象肌肉、脑和肝中那些不同的细胞的？细胞又是怎样互相会合在一起形成一个复杂器官的？细胞的生长是怎样受到调节的？记忆的机制是什么？光究竟怎样在视网膜上激起一个冲动？癌的病因而是什么？精神分裂症的病因是什么？

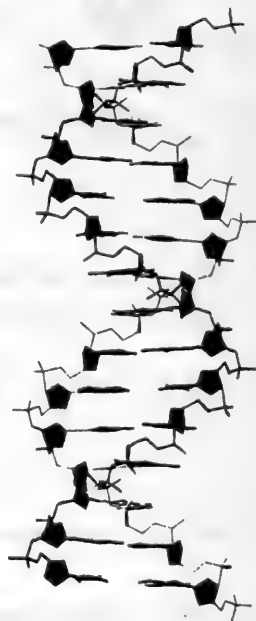


图1-1 DNA 双螺旋模型。  
螺旋的直径约为20 Å。

### 分子模型

生物分子的三维结构和它们的生物功能之间的相互关系是本书的主题。将用空间填充式、球棒式和骨骼式三种原子模型来表示分子的构造。空间填充模型最为真实。在空间填充模型中一个原子的大小和构型取决于它的成键性能和它的范德瓦耳氏半径(图1-2)。几种简单分子的空间填充模型示于图1-3。

球棒式模型不象空间填充式模型那样真实，因为用来表示原子的是半径小于范德瓦耳氏半径的球。但若要看成键情况，却要比空间填充模型更为清楚，因为棒把键明显地表示出来了。棒逐渐变粗或变细告诉我们键是指向纸面的前方或背后。对一个复杂的结构来说，从球棒式模型上看到的東西要比空间填充式模型多。骨骼式模型给出的形象更为简单，它只表示分子的骨架。在这样的模型中，原子并不被明显示出。而原子的位置可以设想在键的交接处及其端点上。骨骼式模型常用来表示象蛋白质分子那样的生物大分子，它们拥有几千个原子。

ATP的空间填充式、球棒式以及骨骼式模型比较于图1-4中。

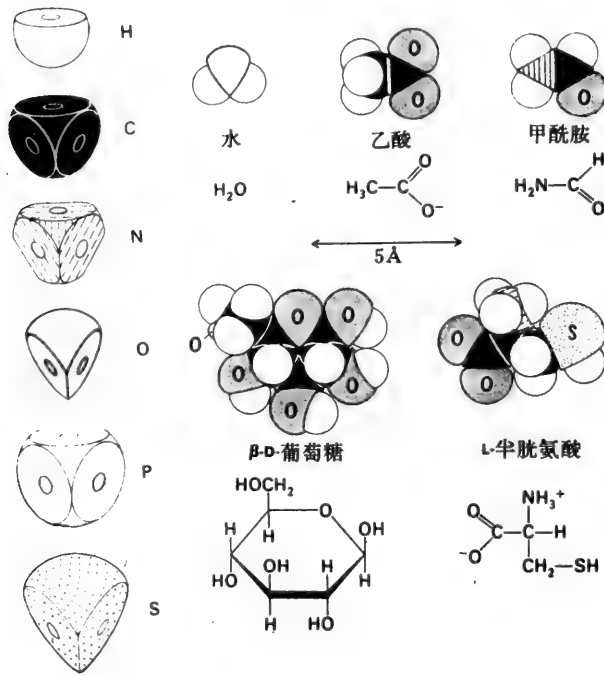


图1-2 氢、碳、氮、氧、磷和硫原子的空间填充模型。

图1-3 水、乙酸、甲酰胺、葡萄糖和半胱氨酸的空间填充模型。

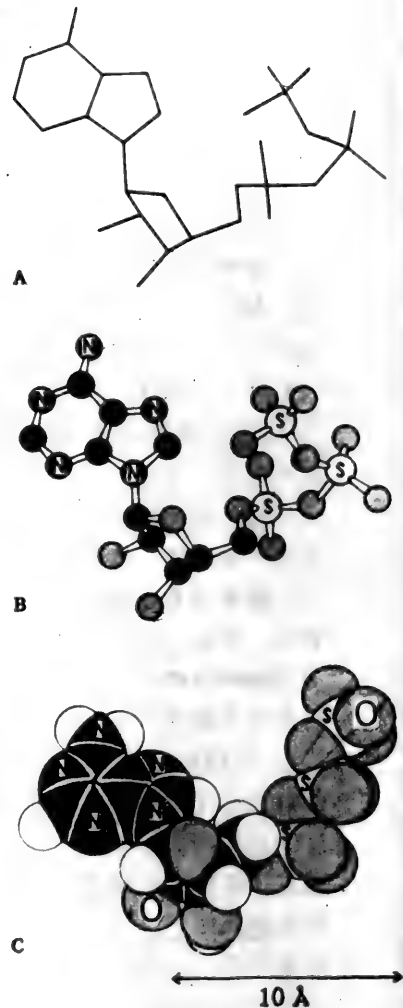


图1-4 ATP的 (A) 骨骼式、(B) 球棒式和 (C) 空间填充式模型的对比。在模型A和B中未示出氢原子。

## 空间、时间和能量

在考虑分子的结构时，要有大小的观念（图1-5）。单位埃（Å）等于 $10^{-10}$ 米（m）或0.1毫微米（nm），是原子水平上常用的长度单位。例如一个C—C键的长度为1.54 Å。象糖和氨基酸这样的较小生物分子，长度一般为几个埃。生物大分子如蛋白质，至少要大10倍。例如血红蛋白、红血细胞中的载氧蛋白，其直径为65 Å。再增大10倍就成为大分子的集合体了。核糖体是细胞中合成蛋白的机器，其直径约为300 Å。大多数病毒的直径在100 Å（10nm）到1000 Å（100nm）的范围内。细胞一般还要大100倍，以微米（μm）计。例如，红血细胞长7 μm（ $7 \times 10^4$  Å）。值得指出，光学显微镜分辨率的极限约为0.2 μm（2000 Å），相当于很多亚细胞器的大小。线粒体是需氧细胞中ATP的主要发生器，它正好被光学显微镜所分辨。我们关于生物结构在1 Å（0.1 nm）至 $10^4$  Å（1 μm）范围内的知识来自电子显微镜和x射

线衍射。

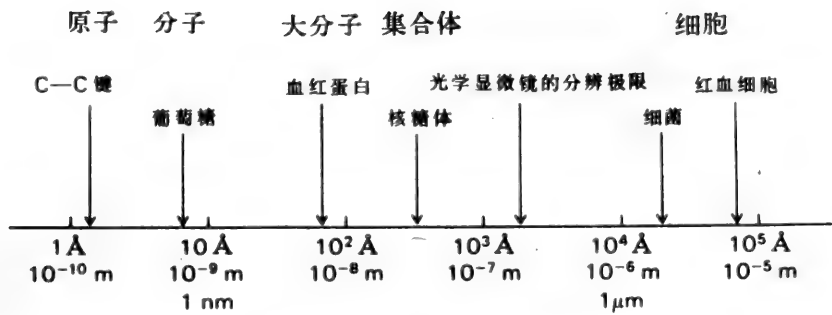


图 1-5 一些生物分子、集合体和细胞的大小。

生命的分子处在不断的变化之中。生物体系中化学反应是由酶催化，它们一般在几毫秒 (ms,  $10^{-3}$  s) 中把底物转化为生成物。有些酶作用更快，只用几微秒 ( $\mu$ s,  $10^{-6}$  s) 的时间。在生物大分子中很多构象变化也很迅速。例如，DNA双螺旋的解链，在复制和表达中很重要，是一个微秒事件。蛋白质的一个结构域相对于另一个结构域的转动能在几毫微秒 (ns,  $10^{-9}$  s) 中进行。大分子中基团间的很多非共价相互作用可在几毫微秒中形成和断裂。即使更快的过程也能用激光的短光脉冲来探查。值得注意，视觉中的原始事件——吸光基团的结构变化——可在吸收一个光子后的几微微秒 (ps,  $10^{-12}$  s) 中发生。显然，生物体系动力学的时间跨度很宽 (图1-6)。鉴别进化时间的跨度也是同样重要的。地球上的生命发生于  $3.5 \times 10^9$  年前，这相当于  $1.1 \times 10^{17}$  秒。

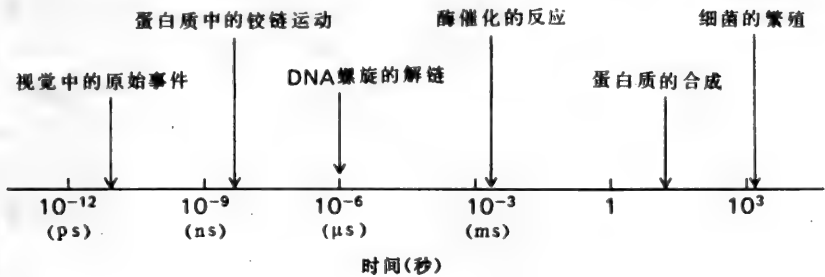


图 1-6 生物体系中若干过程的典型速率。

我们也将关注分子事件中的能量变化 (图1-7)。生命的最终能源是太阳。可见光的能量，以绿光的光子为例，是每摩尔57千卡 \* (kcal/mol)。ATP是能量的通用货币，其可用含量为12 kcal/mol。对比一下，分子中每个振动自由度的平均能要小得多，在25℃下只有0.6 kcal/mol。这点能量要离解共价键是远远不够的 (例如C—C键能为83 kcal/mol)。因此，只要没有酶和能量输入，生物分子的共价骨架是稳定的。而另一方面，热 (运动) 能仍足以使生物体系中的非共价键生成和断裂，它们一般只有每摩尔几个千卡的键能。能量的产生和贮存详见本书的第二篇。

\* 千卡和卡非常用法定计量单位，此处应使用焦耳 (J)。1 cal = 4.1868 J——编辑注。

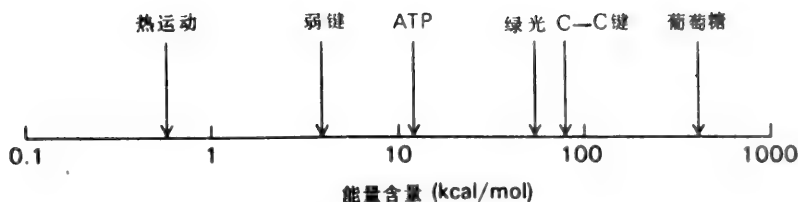


图 1-7 一些生物学上重要的能量值。

## 本书的设计

本书共分五篇，各以下列主题为中心：

- I. 构象和动力学
- II. 代谢能的产生和贮藏
- III. 大分子前体的生物合成
- IV. 信息
- V. 分子生理学

以蛋白质为实例来说明三维结构与生物活性之间的关系是第一篇的主题。肌红蛋白和血红蛋白，是脊椎动物的载氧蛋白，它们的结构和功能将被详细论述，因为这些蛋白质能说明

一些普遍原理。血红蛋白特别有意义，因为它结合氧的性能为其周围的专一分子所调节。血红蛋白的分子病理学，特别是镰刀形细胞贫血症，也要加以论述。然后我们转到酶，并考虑它们究竟如何识别底物以及提高反应速率至百万倍以上。对溶菌酶，羧肽酶A(图 1-8) 以及糜蛋白酶将详加论述，因为研究这些酶后已使催化的很多普遍原理得以澄清。在论述胶原和弹性蛋白这两种结缔组织蛋白的那一章中，构象主题冒出了很不相同的方面。第一篇的最后一章是关于生物膜的引论，而膜是由脂类和蛋白组成的集合体。膜在生物体系中的主要功能是设置分室。

第二篇讲述代谢能的产生和贮藏。首先谈代谢的总战略。细胞将来自燃料分子的能量转化到ATP中去。然后，ATP驱动细胞中大多数需能过程。此外，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)将为生物合成产生还原能力。实现这些反应的代谢途径将详细交代。例如，从葡萄糖产生ATP需要三个系列的反应，即按照糖酵解反应，柠檬酸循环和氧化磷酸化反应的顺序进行。后面两个反应也用于氧化脂肪和一些氨基酸等其它主要燃料来产生ATP。我们在这里看到了分子经

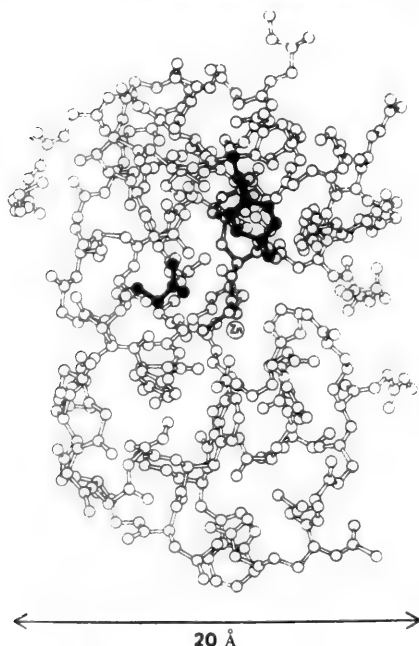


图 1-8 酶-底物复合体的结构。甘氨酸酪氨酸(灰色)与一种消化酶，羧肽酶A相结合。只示出这个酶的四分之一。[依据 W. N. Lipscomb, *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* 15 (1971): 141.]

济的例证。燃料分子的两种贮存形式，即糖原和三酰基甘油(中性脂肪)，也在第二篇中讨论。本书的这个部分结束于光合作用，其中原始事件是电子从一种物质逆化学势梯度向另一种物质的光激活转移。

第三篇谈到大分子前体的生物合成，从合成膜脂类和固醇类化合物谈起。合成胆固醇的途径特别有意义，因为这个27-碳固醇类化合物的全部碳原子来自一个2-碳前体。合成特定氨基酸和血红素基的反应将在下一章内讨论。在这些途径中的控制机制具有普遍意义。核苷酸，即DNA和RNA的活化前体的生物合成也将被考虑。本篇最后一章将讲到代谢的整合。究竟供能反应和耗能反应如何配合在一起去迎合一个生物体的需求呢？

遗传信息的储存、传送和表达将成为第四篇的主题。首先讨论那些揭示遗传物质为DNA以及发现DNA双螺旋的实验，跟着介绍DNA复制的酶催化机制。然后我们将转向DNA中遗传信息的表达，要从信使RNA是蛋白合成中携带信息的中间体的证据讲起。随后要考虑转录过程，它是按照DNA模板给出的指令来合成RNA的过程。这就把我们引向遗传密码，它联系DNA（或其信使RNA的转录本）中碱的顺序与蛋白质中的氨基酸顺序。在一切生物体中，密码都是一样的，它离美妙于简单之中。三个碱基组成一个密码子，它是规定一个氨基酸的单位。信使RNA上的密码子被转移RNA分子按顺序读出，而后者为蛋白质合成中的接合器。我们将进一步考察蛋白质合成的机制，这是一个称为翻译的过程，因为它将核酸的四个碱基配对的字母译成蛋白质的二十个字母。翻译是以核糖体为中心，通过一百种以上的大分子协力参与下进行的。下一章讲述细菌中基因表达的控制。这里将集中考虑大肠杆菌中的乳糖和色氨酸的操纵子，对他们已了解得很详细。

随后将讨论最近对较高级生物中基因表达的研究。它们比细菌包含的DNA要多得多，而且有一个独特的核，使其细胞得以分化。继而考虑病毒的增殖和组装。病毒的组装例示生物大分子形成高度有序结构的一般原理。若干在动

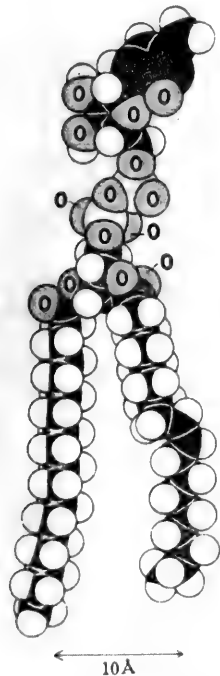


图 1-9 CDP-二酰基甘油的模型，它在合成一些膜脂类中是一个活化中间体。

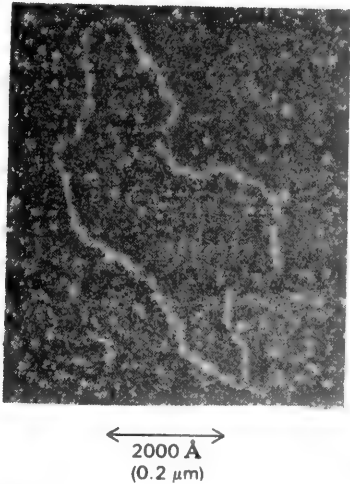


图 1-10 DNA 分子的电子显微照片。[蒙 Dr. Thomas Broker 特许。]

物试验中引起癌症的病毒也将在这里考虑。第四篇在结束的一章中将讨论新基因在重组中形成。DNA的克隆（无性繁殖）的重要性也在这一章中讨论。

第五篇的标题是分子生理学。这是生物化学向生理学的过渡。在本书前面几篇中发展起来的很多概念将在这里得到应用，因为生理学涉及信息、构象和代谢之间的相互作用。我们将

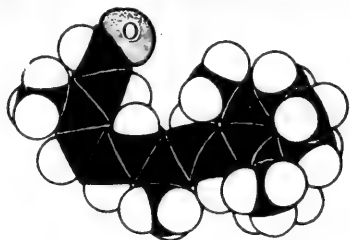


图 1-11 11-顺-视黄醛的模型，它是视紫红质中的吸光基团。这个生色团通过光进行的异构化是视觉刺激中的第一个事件。

将从细胞膜和细菌细胞被膜的集合讲起。细胞怎样规定它们合成的蛋白质的位置？然后将转向免疫反应的分子基础。一个生物体如何识别一个异物？下一章将讲述化学键的键能如何转化成协调动作的问题。最近的研究已经指明，肌肉中的主要蛋白质，肌球蛋白和肌动蛋白，在高等生物的大多数细胞中具有收缩作用。然后将考虑激素作用的分子基础，并着重考虑一些带有共性的主题。然后交代离子，如 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ ，以及分子的运输。分子泵在膜中运输这些离子，并在兴奋中心产生梯度。最后一章讲述感觉过程，并考虑这样的问题：动作电势是怎样由神经细胞传播和通过突触传达的？视网膜视杆细胞是怎样被一个光子引发的？细菌是怎样检察和趋向它周围的养料的？

生物化学的一个最令人满意的特点是它不断丰富我们对发生在一切组织水平上的生物过程的认识。

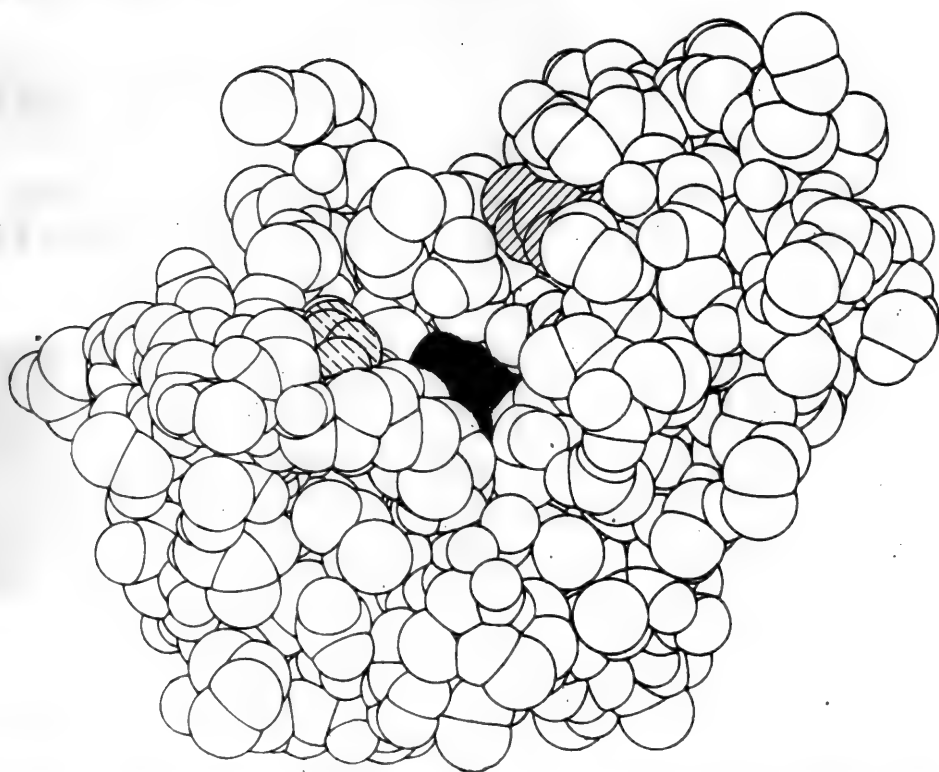
（唐有祺 译）



# 第一篇 构象和动力学

论述时以蛋白质的三维结构与其  
生物活性之间的关系为实例

(唐有祺 译)



核糖核酸酶S,一种水解核糖核酸的酶的模型。活性部位上对催化起关键作用的氨基酸残基着色示出。这个酶的三维结构是为 Frederic Richards 和 Harold Wyckoff 所解出。[依据 Dr. Frederic Richards, Steven Anderson 和 Arthur Perlo 好意提供的图绘制。]

## 第2章 蛋白质的结构和功能导论

蛋白质几乎在所有生物过程中起着关键作用。它们功能的重要性和广阔范围可以例示如下:

1. **酶的催化作用。**差不多所有生物体系中的化学反应都被一种称为酶的专一大分子所催化。这些反应中有的很简单,例如二氧化碳的水合反应。而另一些反应,如复制一个完整的染色体的反应,是十分复杂的。几乎所有酶都表现出巨大的催化能力。它们一般把反应速率提高至少一百万倍。诚然,在没有酶的情况下化学转化很少在活体中能以可觉察的速度进行。几千种酶已被表征,而其它不少已经得到晶体。最引人注目的事实是所有已知的酶是蛋白质。因此,蛋白质扮演了一个唯一能决定生物体系中化学转化模式的角色。
2. **运载和贮存。**很多小分子和离子是由专一蛋白质来运载的。例如,血红蛋白在红血球中运载氧,而一种相似的蛋白质,肌红蛋白则在肌肉中输氧。铁在血浆中为转铁蛋白所运载,而在肝中则与另一种蛋白质,即铁蛋白作为复合体贮存起来。
3. **协调动作。**蛋白质为肌肉之主要组分。肌肉的收缩是通过两种蛋白丝的滑动来完成的。在微观水平上,这样的协调动作,正如有丝分裂中染色体的运动以及精子靠鞭毛的推动等,也是由蛋白质组成的收缩集合体产生的。
4. **机械支持。**皮肤和骨骼的高抗张强度是从称为胶原的一种纤维蛋白取得的。
5. **免疫保护。**抗体是高度专一的蛋白质,它们能识别并与病毒、细菌以及来自其它有

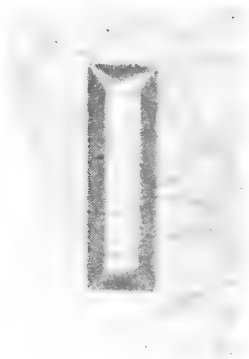


图2-1 己糖激酶的一个晶体的显微照片,它是利用葡萄糖的一种关键酶。[蒙Dr. Thomas Steitz和Dr. Mark Yeager 特许。]

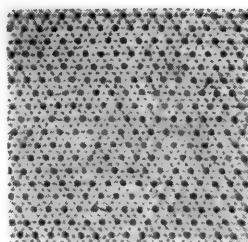


图2-2 昆虫飞翔肌肉截面的电子显微照片示出两种蛋白丝形成的六方排布。[蒙Dr. Michael Reedy特许。]

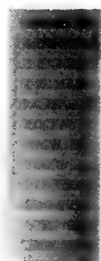


图2-3 胶原纤维的电子显微照片。[蒙Dr. Jerome Gross和Dr. Romaine Bruns特许。]

机体的细胞这样的异物结合。蛋白质于是在区别自身和非自身中起重要作用。

6. **产生和传递神经冲动。**神经细胞对特定刺激的反应是由受体蛋白转达的。例如视紫

红质是视网膜杆细胞中的光受体蛋白。能为象乙酰胆碱这样的专一小分子触发的受体分子，是负责在突触，即神经细胞的交接处，传递神经冲动的。

7. 生长和分化的控制。  
遗传信息的受控顺序表达是对细胞有秩序的生长和分化十分重要的。细胞的基因组中每一次只有一小部分被表

达出来。在细菌中阻遏物蛋白质是使细胞的DNA中某些特定片段不被表达的重要控制组分。蛋白质在分化中所起作用颇不相同。这里可以神经生长因子为实例。它是在高等有机物中引导神经网络生成的一种蛋白复合体。

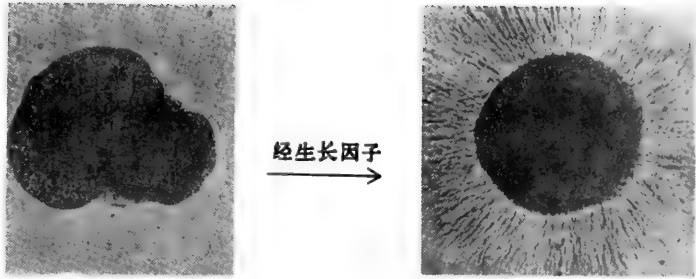


图 2-4 神经节的显微照片示出神经在加入神经生长因子，即一种蛋白质的复合体以后增生的情况。[蒙Dr. Eric Shooter特许。]

### 蛋白质由氨基酸构成

氨基酸是蛋白质的基本结构单位。氨基酸由一个氨基、一个羧基，一个氢原子和一个与被称为 $\alpha$ -碳的碳原子相连的独特R基所组成（图 2-5）。R基由于不久就会清楚的理由被称

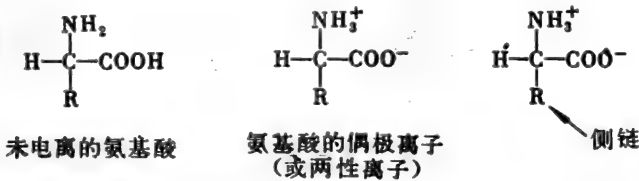


图2-5 氨基酸的未电离形式和两性离子形式的结构。

为侧链。在中性pH下的溶液中氨基酸主要是偶极离子（或两性离子），而不是未电离的分子。在氨基酸的偶极形式中，氨基被质子化（ $-\text{NH}_3^+$ ），而羧基已离解（ $-\text{COO}^-$ ）。氨基酸的电离状态随pH而改变（图 2-6）。在酸溶液中（例如pH 1），羧基并不电离（ $-\text{COOH}$ ），而

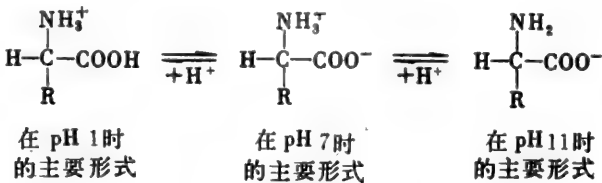


图 2-6 氨基酸的电离状态是pH的一个函数。

氨基是电离的（ $-\text{NH}_3^+$ ）。在碱性溶液中（例如pH 11），羧基离解（ $-\text{COO}^-$ ），而氨基是不电离的（ $-\text{NH}_2$ ）。pH的概念以及氨基酸的酸碱性质将在本章附录中进一步讨论。

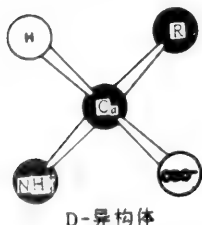
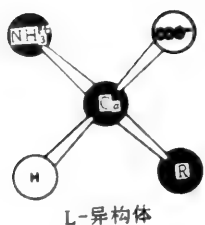


图2-7 氨基酸的L-和D-异构体的绝对构型。

$\alpha$ -碳原子周围的四个不同的基团按照四面体向排布，使氨基酸取得旋光性。两个互为镜像的形式称为L-异构体和D-异构体（图2-7）。只有L-氨基酸参与蛋白质的组成。这样，以后就无需指明哪一种旋光异构体，讲到蛋白质时指的都是L-异构体，除非另有声明。

在蛋白质中经常找到的有二十种大小、形状、电荷、形成氢键的能力和化学活性都有差异的侧链。诚然，在从细菌到人类的所有物种中一切蛋白质都是由这一组二十种氨基酸构成的。蛋白质的这一组字母至少已用了二十亿年。通过蛋白质实现的功能的范围所以如此宽广，是由于这二十种组件变化多端的结果。在以后的章节中我们将探索这套字母产生复杂的三维结构的方式，而后者是使蛋白质能于参加如此众多生物过程的基础。

让我们看一看氨基酸的阵容。最简单的一种是甘氨酸，它的侧链是一个氢原子（图2-8）。丙氨酸的侧链为一甲基。侧链为烃基的其他氨基酸为缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸和脯氨酸。但是脯氨酸不

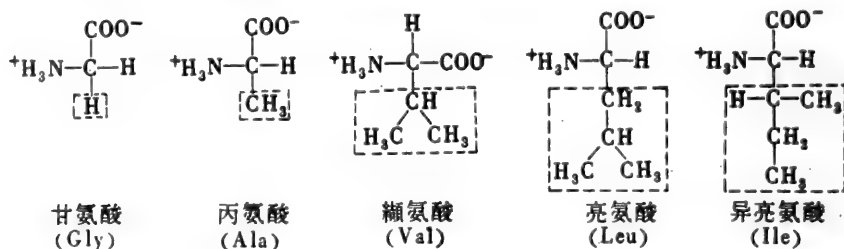


图2-8 侧链为脂肪烃基的氨基酸。

同于其他十九种基本氨基酸，它的氨基是一个仲氨基，而不是一个伯氨基（图2-9）。严格而论，脯氨酸不是一个氨基酸，而是一个亚氨基酸。脯氨酸的侧链与氨基和 $\alpha$ -碳二者相连，从而形成一个环结构。

丝氨酸和苏氨酸是两种侧链为脂肪羟基的氨基酸（图2-10）。

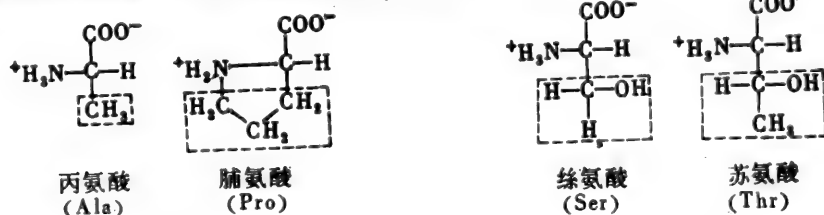


图2-9 脯氨酸与其它常见氨基酸不同，它有一个仲氨基。

图2-10 丝氨酸和苏氨酸的侧链为脂肪羟基。

侧链为芳香族基的氨基酸有三种：苯丙氨酸，酪氨酸和色氨酸（图2-11）。

上述氨基酸的侧链在生理pH下都不带电荷。现在我们要转向一些侧链带电荷的氨基酸。赖氨酸和精氨酸在中性pH下带正电荷，而组氨酸带正电荷与否当视其局部环境而定。这些碱性氨基酸示出于图2-12中。谷氨酸和天冬氨酸的侧链是带负电荷的（图2-13）。这些氨基

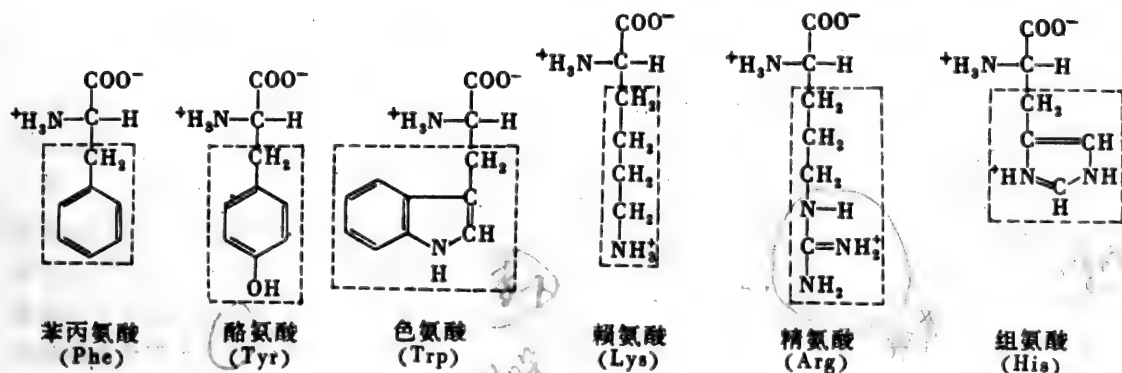


图2-11 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的侧链为芳香族基。

图2-12 赖氨酸、精氨酸和组氨酸带有碱性侧链。

酸称为谷氨酸根 (glutamate) 和天冬氨酸根 (aspartate), 以便强调指出它们在生理 pH 下带有负电荷这个事实。谷氨酸和天冬氨酸不带电荷的衍生物是谷酰胺和天冬酰胺 (图2-14), 而它们都带一个末端酰胺基, 而不是一个羧酸根。最后, 要提到两种氨基酸, 它们的侧链含有一个硫原子: 甲硫氨酸和半胱氨酸 (图2-15)。不久将谈到, 半胱氨酸在某些蛋白中通过形成二硫键而起着特殊作用。

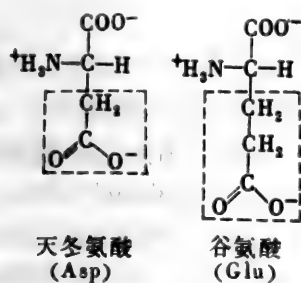


图2-13 天冬氨酸和谷氨酸有酸性的侧链。

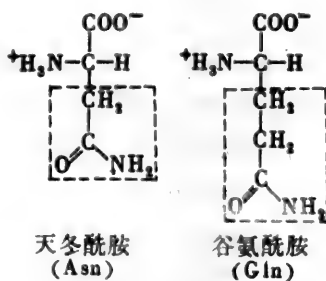


图2-14 天冬酰胺和谷氨酰胺有酰胺的侧链。

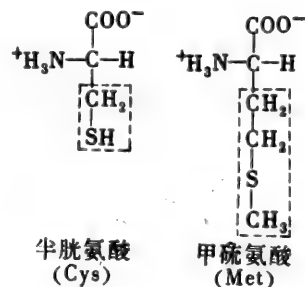


图2-15 半胱氨酸和甲硫氨酸有含硫的侧链。

表2-1 氨基酸的简写和符号

氨基酸	三个字母的简写	一个字母的符号	氨基酸	三个字母的简写	一个字母的符号
丙氨酸 (alanine)	Ala	A	组氨酸 (histidine)	His	H
精氨酸 (arginine)	Arg	R	异亮氨酸 (isoleucine)	Ile	I
天冬酰胺 (asparagine)	Asn	N	亮氨酸 (leucine)	Leu	L
天冬氨酸 (aspartic acid)	Asp	D	赖氨酸 (lysine)	Lys	K
天冬酰胺 (asparagine)	Asx	B	甲硫氨酸 (methionine)	Met	M
或天冬氨酸 (aspartic acid)			苯丙氨酸 (phenylalanine)	Phe	F
半胱氨酸 (cysteine)	Cys	C	脯氨酸 (proline)	Pro	P
谷酰胺 (glutamine)	Gln	Q	丝氨酸 (serine)	Ser	S
谷氨酸 (glutamic acid)	Glu	E	苏氨酸 (threonine)	Thr	T
谷酰胺 (glutamine)	Glx	Z	色氨酸 (tryptophan)	Trp	W
或谷氨酸 (glutamic acid)			酪氨酸 (tyrosine)	Tyr	Y
甘氨酸 (glycine)	Gly	G	缬氨酸 (valine)	Val	V

## 补充二十种基本氨基酸的特殊氨基酸

有些蛋白质含有特殊氨基酸，它们是普通氨基酸在进入多肽链后被修饰而生成的。例如，

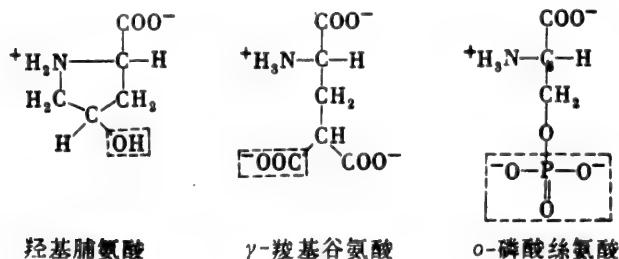


图2-16 蛋白中若干被修饰的氨基酸残基：羟基脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和磷酸丝氨酸。多肽链合成后加进去的基团用虚线框示出。

胶原含有羟基脯氨酸，为脯氨酸的一个羟化衍生物（图2-16）。加入的羟基使胶原纤维趋于稳定，详情容后讨论（本书148页）。这种修饰的生物学意义在坏血病中当显然可见，后者是胶原未被充分羟化所造成的。另一特殊氨基酸是γ-羧基谷氨酸。凝血酶原为一凝血蛋白，其中谷氨酸羧化不完全，可以导致出血症（本书136页）。蛋白中最

常见到的被修饰氨基酸是磷酸丝氨酸。若干激素的作用是以各种蛋白质中某些特定丝氨酸残基的磷酸化和脱磷酸化为媒介的（本书279页）。

## 氨基酸通过肽键相联形成多肽链

在蛋白质分子中，把一个氨基酸的α-羧基与另一氨基酸的α-氨基联接起来的是一个肽键（也称为酰胺键）。两个氨基酸缩去一个水分子后生成一个二肽的情况示出于图2-17中。这个

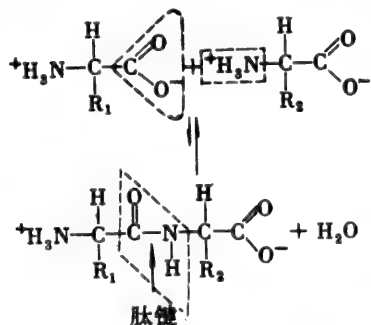


图2-17 一个肽键的形成。

反应的平衡对水解要比缩合有利得多。因此，合成肽键需要消耗自由能，而多肽之水解在热力学上犹如顺坡下山。

很多个氨基酸，通常超过一百个，由肽键相连形成一个多肽链，它是一个没有分支的结构（图2-18）。在多肽中一个氨基酸单位称为一个残基。一个多肽链是有方向的，

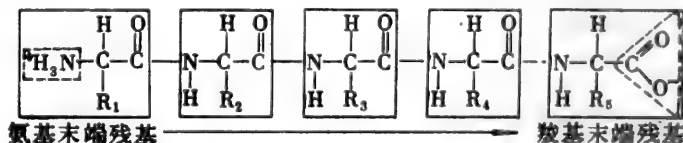


图2-18 一个五肽。组成它的氨基酸残基被框出。链是从氨基末端开始的。

因为它的构造单元的两端不同，即α-氨基和α-羧基。按惯例，氨基端被认定为多肽链的头。多肽链中氨基酸的顺序是从氨基端残基写起的。这样，在丙氨酸-甘氨酸-色氨酸这个三肽中，

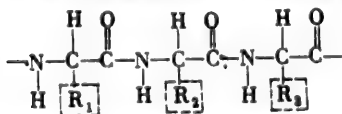


图2-19 多肽链由一个规则地重复的骨架和变化多端的R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>侧链组成。

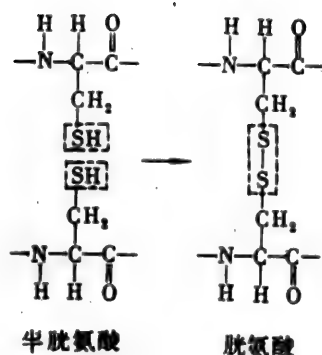
丙氨酸是氨基端残基，而色氨酸是羧（基）端残基。不难看出，色氨酸-甘氨酸-丙氨酸不是同一个三肽。

多肽链由一个规则地重复的主链和变化多端的侧链两部分组成（图2-19）。而主链常被称为骨架。

在有些蛋白质中若干侧链通过二硫键交联起来了。这些

交联是通过半胱氨酸残基的氧化形成的。得出的二硫化物称为胱氨酸（图2-20）。在蛋白质中一般并无其它共价交联。

图2-20 一个二硫桥（—S—S—）是从两个半胱氨酸残基中的硫氢基（—SH）形成的。产物为一个胱氨酸残基。



## 一个或几个多肽链组成蛋白质

很多蛋白质，如肌红蛋白，是由一个单一的多肽链组成的。其它蛋白分子可以含有两个或更多相同或不同的链。例如血红蛋白分子是由一种链和另一种链各两个组成的。这四个链通过非共价作用力结合在一起。有些多链蛋白分子则通过二硫键联结在一起。例如，胰岛素的两个链是通过两个二硫键联结起来的。

## 蛋白质可以通过各种方法予以提纯

为了弄清楚蛋白质起作用的机理，对它进行提纯是一个不可缺少的步骤。几千种蛋白已被提纯。根据大小、溶解度、电荷和特定的结合亲和性等特征，可以在蛋白质相互之间以及它们与其它种类的分子之间进行分离。在提纯一种蛋白质时，各种方法都要尝试，而它们的效率将从这种蛋白质的某个独特性质的检定结果中予以评价。例如检定一个酶通常根据的是它的专一催化活性。蛋白质的总量也要计量一下，从而可以测出每一步中提纯的程度。

蛋白质可以在透析中通过一个半透膜与小分子分开（图2-21）。质量超过约15千道尔顿（kdal）\*的分子将留在通常的透析袋中，而较小的分子和离子会穿过这样的透析膜，进到袋外的透析液中去。根据分子大小来进行的分离，也可以通过凝胶过滤

色谱来实现（图2-22）。样品从柱顶加进去，柱内填充一种水合程度高而不溶的碳水化合物高聚物制成的有孔小珠，其直径通常为0.1mm。常用的商品制剂是 Sephadex。小分子可以进

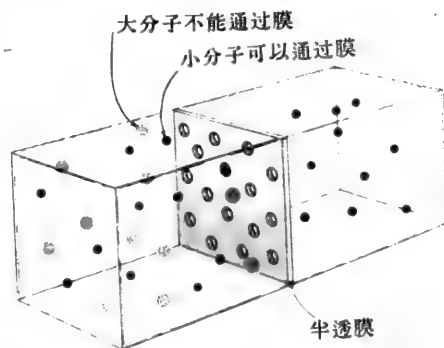


图2-21 通过透析根据分子的大小来分离分子。

\* 道尔顿——一个很接近于氢原子质量的质量单位（在原子质量标度上精确地等于1.0000）。

“道尔顿”和“分子量”这两个术语可以通用：例如一个20,000道尔顿的蛋白质，其分子量为20,000。

此单位是按道尔顿·J. (John Dalton) (1766—1844) 来命名的。他发展了物质的原子理论。

千道尔顿（kdal）——等于1000道尔顿的一个质量单位。大多数蛋白质的质量介于10和100kdal之间。



入这些小珠，而大分子就进不去。结果是小分子分布在小珠内部和小珠之间的水溶液中，而大分子只能在珠间的溶液中。大分子在柱中流动较快，从而最先流出，因为它们只能容身于较小的珠间容积中。

蛋白质也可以根据它们的净电荷通过离子交换色谱来分离。若某一蛋白质在 pH 7 下带净正电荷，它通常会与一个含有羧基的离子交换柱结合，而带负电荷的蛋白质就不会这样。上述带正电荷的蛋白质可从柱中脱落下来，只要在洗脱缓冲液中加入氯化钠或其他盐类。钠离子会与蛋白质分子上带正电荷的基团竞争，结合到柱上。正电荷密度较低的蛋白质将首先脱落，然后脱下密度较高的。净电荷之外的其它因素也会影响蛋白质在离子交换柱上的行为。蛋白质的净电荷也影响它在电场中迁移的速度。这个原理在电泳中得到应用，电泳技术以后（本书 67 页）将详细论述。但这里应提到的是电泳的分辨率很高。值得注意的是：存在于大肠杆菌这样一种简单的细菌中的一千多种蛋白质能在二维电泳的一次实验中全部得到分辨（图2-23）。

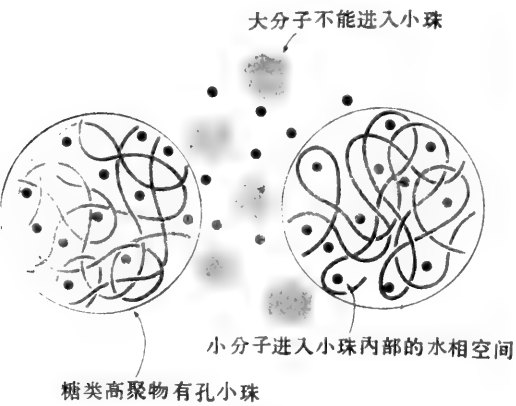


图2-22 通过凝胶过滤色谱根据分子的大小来分离分子。



图2-23 大肠杆菌中蛋白质的二维电泳。  
从这个细菌中所得的一千种以上的蛋白质已被分辨。这些蛋白在水平和垂直方向各按它们的等电点 pH 和分子量进行了分离。[ 蒙 Patrick H. O'Farrell 特许。 ]

亲和色谱法是另一个很有效力和广泛应用的蛋白质提纯方法。这种方法利用很多蛋白质对某些特定化学基团的高亲和性。例如一种叫伴刀豆球蛋白 A 的植物蛋白，能在其粗提取液

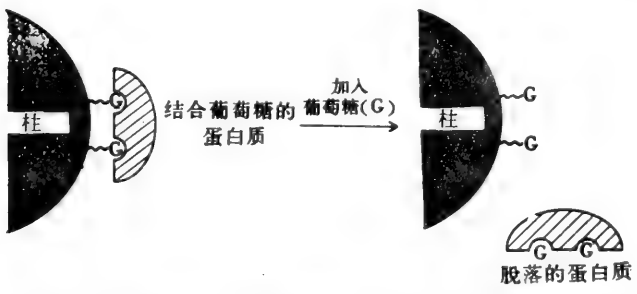


图2-24 伴刀豆球蛋白A（以斜影线示出）在一个含有共价结合的葡萄糖残基（G）的柱上进行亲和色谱分离

通过一个柱后得到提纯，后者含有通过共价键结合上的葡萄糖残基。伴刀豆球蛋白A 因与葡萄糖有亲和性，从而能与这样的柱结合，而其他蛋白质大多不能吸附到柱上。结合上去的伴刀豆球蛋白A 可以在加入浓葡萄糖溶液后脱落下来。溶液中的葡萄糖可以从伴刀豆球蛋白A 结合部位上将柱上的葡萄糖置换下来(图2-24)。

推广一下，亲和色谱法可以有效地用来分离一个能识别X基的蛋白质：（1）将X基或其衍生物共价结合在柱上；（2）加蛋白质的混合液到柱上，并用缓冲液除去未与柱结合的蛋白质；（3）加入含可溶X基的高浓度溶液去洗脱待分离的蛋白质。

蛋白质具有为基因所规定的唯一氨基酸顺序

在1953年，桑格（Sanger, F.）为蛋白激素胰岛素测定了氨基酸顺序（图2-25）。这个

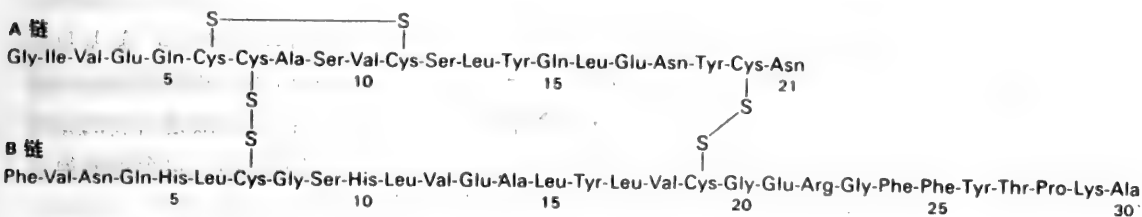


图2-25 牛胰岛素的氨基酸顺序。

工作在生物化学中是一个里程碑，因为它第一次展示了蛋白质具有一个确切的氨基酸顺序。这个成就激发了其他科学家为各种蛋白质进行顺序研究。诚然，现在已有几百种蛋白质，它们的全部氨基酸顺序成为已知。突出的事实是每种蛋白质具有唯一而确切的氨基酸顺序。在1960年前后进行的一系列深入的研究指明，蛋白质的氨基酸顺序是由遗传决定的。在遗传特征分子DNA中，核苷酸的顺序规定RNA中核苷酸的一个互补顺序，而后者又规定蛋白质中的氨基酸顺序（本书 465 页）。更有甚者，各种蛋白质是通过同一个机制从氨基酸合成出来的。

测定蛋白质的氨基酸顺序的重要意义有四个方面。第一，测定蛋白质中的顺序是走向阐明其生物活性分子基础中很重要的一步。如与其他化学和物理数据一起考虑，顺序更能给出信息。其次，为了推引多肽链折叠成高度专一的三维形体所受制的规则，就需要知道各种蛋白质的顺序和细致的三维结构。氨基酸顺序是联系DNA中遗传信息与作为蛋白质生物功能基础的三维结构之间的桥梁。第三，氨基酸顺序的改变可以产生异常功能和疾病。致命的疾病，如镰刀形红细胞贫血病，是由于在一个蛋白质中改变了一个氨基酸产生的。因此，顺序测定成为分子病理学的一个部分，后者是医学中的一个新生的领域。最后，蛋白质的氨基酸顺序很能指明它的进化史。各不相关的蛋白质的氨基酸顺序很不相同。蛋白质只当具有同一祖先时才具有相似的氨基酸顺序。所以进化中的分子事件能从氨基酸顺序予以追溯。

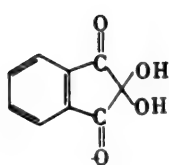
测定氨基酸顺序的实验方法

我们首先考虑一个短肽的顺序是怎样测定的。现设肽中有六个氨基酸残基，其顺序如下：

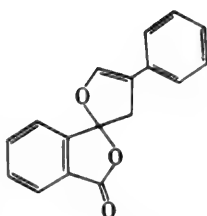


式中所用的是表2-1（本书 11 页）中给出的标准简写。首先，测定肽的氨基酸组成。可将肽

蛋白质——1838年伯齐利厄斯，J.J.（Jöns J. Berzelius）造protein（蛋白质）这个字来强调这一类分子的重要性。此字源于希腊字 proteios，意谓“属于头等”。



水合茚三酮



荧光胺

放入 6 mol/L HCl 中在 110°C 下加热 24 小时，使它水解成各个氨基酸组分。水解液中的氨基酸可以在磺化聚苯乙烯柱上进行离子交换色层分离。分离出来的氨基酸可以在与水合茚三酮一起加热时根据产生的颜色加以检测： $\alpha$ -氨基酸给出深蓝色，而象脯氨酸这样的亚氨基酸则给出黄色。这种方法很灵敏：它甚至可以检测出一微克的氨基酸，而一个拇指指纹印中就可能含有这么多。氨基酸的数量正比于与茚三酮一起加热后

的溶液的吸光率。应用荧光胺可检测少到几个毫微克的氨基酸，前者可与后者的  $\alpha$ -氨基反应，生成荧光性质强的产物。氨基酸根据洗脱体积，即从柱上脱下氨基酸所需应用缓冲溶液的体积，可以鉴别不同的氨基酸（图 2-26）。将水解液の色层谱图与标准氨基酸混合物的谱图

进行对比后指出，这个肽的氨基酸组成为

(Ala, Arg, Asp, Gly<sub>2</sub>, Phe)

括号表示：这只是肽的氨基酸组成，而不是它的顺序。

蛋白质或肽的氨基末端残基可以用与它生成稳定共价键的化合物来标记它，并进行鉴别（图 2-27）。氟二硝基苯（FDNB）是桑格（Sanger）首先为此目的应用的化合物，它与不带电荷的  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 基反应后使肽生成黄色二硝基苯（DNP）衍生物。DNP 与末端氨基之间的键在使肽键水解的条件下也能保持稳定。DNP-

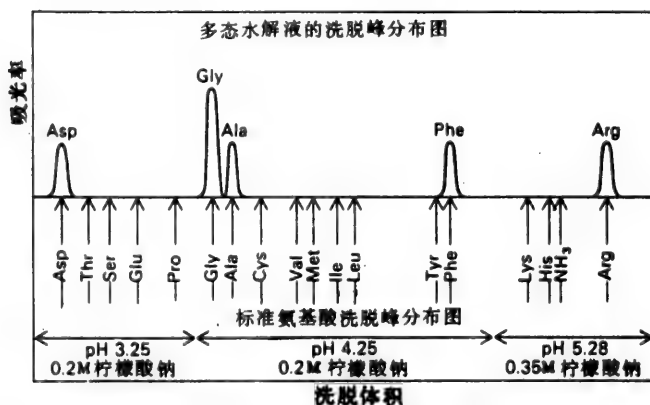
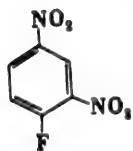


图 2-26 肽水解液中各种氨基酸可以在磺化聚苯乙烯树脂柱(如 Dow ex-50)上进行离子交换色层分离。pH 递增的缓冲液用来从柱上洗脱氨基酸。具有一个酸性侧链的天冬氨酸第一个出现，而带有碱性侧链的精氨酸落在最后。(图中 M = mol/L——编辑注)

肽在 6 mol/L 的 HCl 中水解后给出一个 DNP-氨基酸，而通过其色谱性质被鉴定为 DNP-丙氨酸。

现在丹磺酰氯常被用来鉴定氨基末端残基。它与氨基反应后生成荧光性质强和稳定的磺胺衍生物。肽键水解后若干毫微克的氨基末端残基就可予以鉴定。



氟二硝基苯

虽然 DNP 和丹磺酰氯方法对测定氨基末端残基很有威力，它们并不能在同一个肽上重复应用，因为肽在酸-水解一步中已完全降解。埃德曼 (Pehr Edman) 设计一种方法来标记氨基末端残基，并使它从肽中断裂，而不致断裂其他氨基酸残基之间的肽键。埃德曼 (Edman) 降解能顺序从肽的氨基端将残基一个一个地脱下来（图 2-28）。异硫氰酸苯酯与肽中不带电荷的末端氨基反应生成苯氨基硫甲酰衍生物。在微酸性条件下将脱

下一个末端氨基的环衍生物，而留下一个除了去掉一个氨基酸外原封不动的肽。这个环化合物是乙内酰苯硫脲 (PTH)-氨基酸。PTH-氨基酸可以通过色层分析程序予以鉴定。另外，短了一个氨基酸的肽的氨基酸组成：

(Arg, Asp, Gly<sub>2</sub>, Phe)

可以与原来的肽的组成进行比较:

(Ala, Arg, Asp, Gly<sub>2</sub>, Phe)

这些分析结果就差一个丙氨酸残基。这说明, 丙氨酸是原来肽中的氨基末端残基。Edman程序可以在短了一个氨基酸的肽上重复进行。第二轮降解后给出的氨基酸分析为

(Arg, Asp, Gly, Phe)

说明从氨基端数起第二个残基为甘氨酸。这个结论可以通过色谱鉴定从第二轮Edman降解中得出的PTH-甘氨酸后予以确证。再来三轮Edman降解将指明原来的肽的整个顺序。

测定蛋白质氨基酸顺序实验的策略是分而治之。一个蛋白质按专一的方式断裂成较小的肽, 而后者可以很顺利地用Edman方法确定其顺序。专一的断裂可以用化学或酶的方法完成。例如威特科普 (Bernhard Witkop) 和格罗斯 (Erhard Gross) 发现, 溴化氰 (CNBr) 只在甲硫氨酸残基的羧端劈裂多肽链 (图2-29)。含有10个甲硫氨酸的蛋白质应用溴化氰劈裂后通常给出11个肽。高度专一的断裂也可以应用胰蛋白酶中取得, 后者是从肠液中取得的蛋白水解酶。胰蛋白酶断裂多肽链于精氨酸和赖氨酸残基的羧基一侧 (图2-30)。含有9个赖氨酸和7个精氨酸的蛋白质经过胰蛋白酶消化作用后, 一般给出17个肽。每个胰蛋白酶解肽段, 除蛋白质的羧基末端肽外, 都将由精氨酸或赖氨酸结尾。表2-2中给出其他专一裂解多肽链的方式。

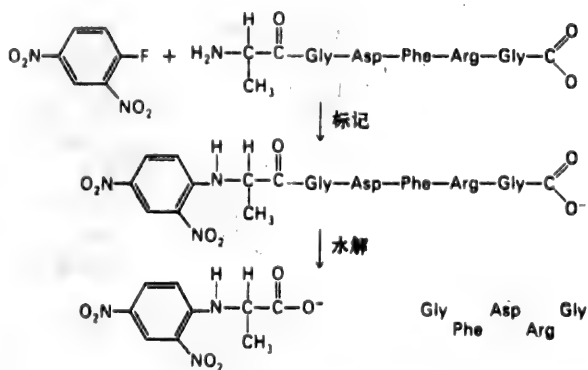
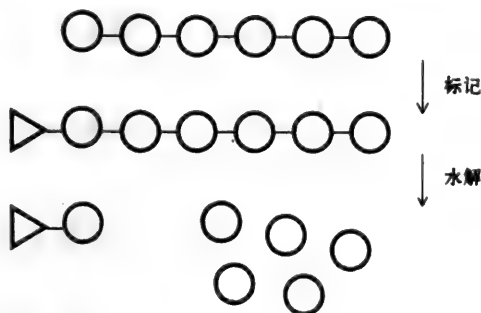
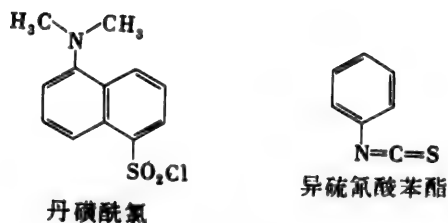


图2-27 肽中氨基末端残基的测定。氟二硝基苯 [桑格 (Sanger) 试剂] 用来标记肽, 然后进行水解。DNP-氨基酸 (在本例中为 DNP-丙氨酸) 通过其色谱特性予以鉴定。

表2-2 多肽链的专一裂解

试 剂	断 裂 部 位	试 剂	断 裂 部 位
<b>化学断裂</b>		<b>酶裂解</b>	
溴化氰	甲硫氨酸残基的羧基侧	胰蛋白酶	赖氨酸和精氨酸残基的羧基侧
羟胺	天冬酰胺-甘氨酸键	clostripain	精氨酸残基的羧基侧
2-硝基-5-硫代氨酸	半胱氨酸残基的氨基侧	葡萄球菌蛋白酶	天冬氨酸和谷氨酸残基的羧基侧
苯甲酸盐			(谷氨酸只在特定条件下)

# 埃德曼降解

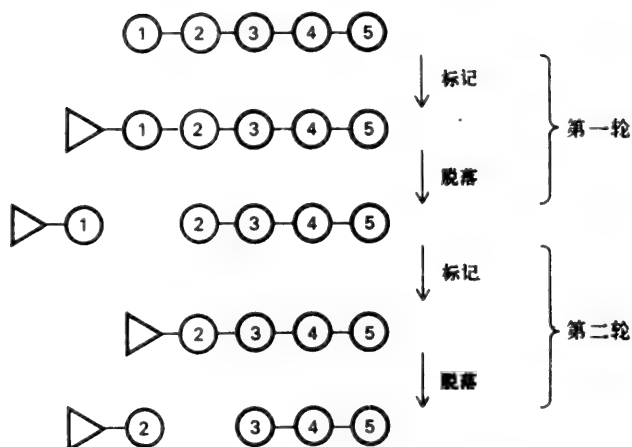


图2-28 埃德曼 (Edman) 降解。标记后的氨基末端残基 (第一轮中为 PTH 丙氨酸) 可以脱下, 而不致水解肽的其余部分。这样, 缩短了的肽 (Gly-Asp-Phe-Arg-Gly) 的氨基末端残基可以在第二轮中测定。再来三轮Edman降解可以得出原来的肽的全部顺序。

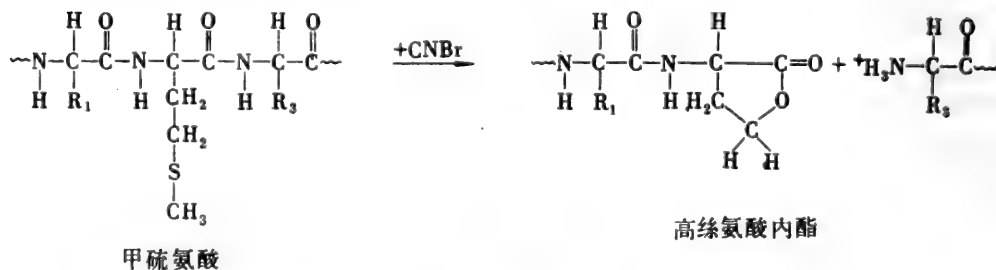


图2-29 溴化氰在甲硫氨酸的羧基侧裂解多肽。

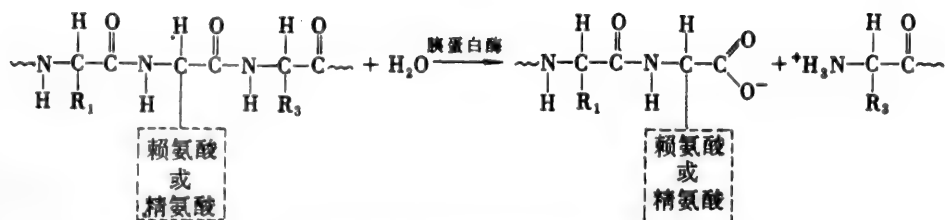


图2-30 胰蛋白酶在精氨酸或赖氨酸的羧基一侧水解多肽。

从专一的化学或酶裂解中得出的肽可以通过色谱方法予以分离。每个肽经纯化后就可应用Edman法测定其顺序。到这里，蛋白质中各片段的氨基酸顺序已知，而这些片段的次序都尚未确定。这个必要的附加信息是从所谓重叠肽段中取得的（图2-31）。应用胰蛋白酶之外的酶可在其他键上断裂多肽链。例如，糜蛋白酶优先在芳烃和其他庞大的非极性残基的羧基一侧裂解。由于糜蛋白酶解肽段与两个或更多的胰蛋白酶解肽段交叠，可以用来确定它们的次序。这样，蛋白质的全部氨基酸顺序就被确定下来了。

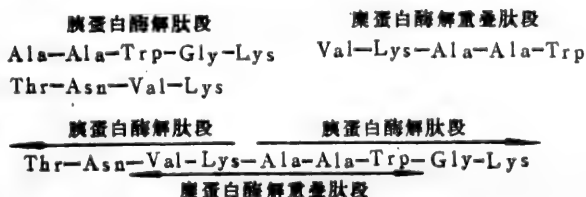


图2-31 从糜蛋白酶消化作用中所得的肽段与两个胰蛋白酶解肽段交叠，从而确立了它们的次序。

这些方法适用于由一个单一的没有二硫键的多肽链组成的蛋白质。但若蛋白质中含有二硫键或一个以上链时，弄清顺序还需要采取其他步骤。若其中两个或更多的多肽链是通过非共价键结合在一起的，那末只需要象脲或盐酸胍这样的变性剂就可以离解这些多肽链了。这些离解出来的链需要先分离，然后再开始测定顺序。对于那些由共价的二硫键联接起来的多肽链，如胰岛素中那样，就需要用过甲酸的氧化作用来裂解二硫键，得出磺基丙氨酸残基（图2-32）。

分析蛋白质结构已因顺序分析仪，一种自动测定氨基酸顺序的仪器的发展，而已显著加速。蛋白质的薄膜在一个旋转的圆柱形杯中受到Edman降解。试剂和抽提溶剂流过蛋白质的固化膜，而脱下来的PTH-氨基酸通过高压液相色谱来鉴定。每一轮Edman降解可在不到两小时中完成。顺序分析仪可以测定包含多至一百个氨基酸的多肽或蛋白质的氨基酸顺序。

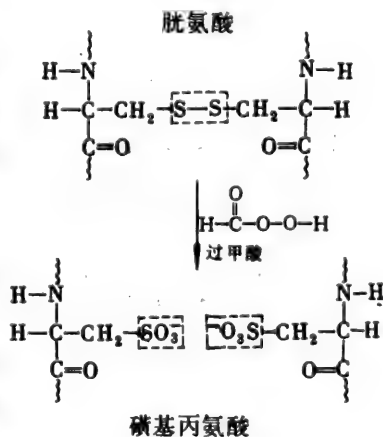


图2-32 过甲酸裂解二硫化物。

## 多肽链的构象

蛋白质一个引人注目的特征在于它们都有一个确定的三维结构。一个伸展开来的或随机排布的多肽链是没有生物活性的，正如不久将要谈论到的那样。功能来自构象，而后者为原

子在一个结构中的三维排布方式。氨基酸顺序的重要性在于它规定了蛋白质的构象。

在30年代后期，鲍林，L. (Linus Pauling) 和科里，R. (Robert Corey) 开创了氨基酸

和肽类的精确结构的 x 射线晶体学研究。他们的

目的在于取得这些构造单元的标准键长和键角，

然后应用这个信息来推测蛋白质的构象。他们发

现的重要结果之一为肽单位的刚性和共面性。被

取代的氨基上的氢几乎总与羰基的氧处在反位

(图2-33)。肽单位中羰基碳原子与氮原子之间

所成的键没有转动的余地，因为它具有部分双键

性质(图2-34)。这个键的长度为 $1.32\text{\AA}^*$ ，介于

单键C—N ( $1.49\text{\AA}$ ) 和双键C=N ( $1.27\text{\AA}$ )

之间。相反， $\alpha$ -碳原子与羰基碳原子之间的键是

一个纯粹的单键。 $\alpha$ -碳原子与氮原子之间的也是

一个这样的单键。因此，在刚性的肽单位两侧的

这些键倒是具有充分转动自由的(图2-35)。围绕这些键进行的转动通过角 $\psi$ 和 $\phi$ 来代表

(图2-36)。如每一个氨基酸残基的 $\psi$ 和 $\phi$ 角已知，多肽主链的构象就被完全确定。

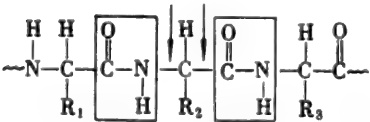


图2-33 肽基是一个刚性的共面单位。标准键长以 $\text{\AA}$ 为单位在图中示出。

这些键倒是具有充分转动自由的(图2-35)。围绕这些键进行的转动通过角 $\psi$ 和 $\phi$ 来代表(图2-36)。如每一个氨基酸残基的 $\psi$ 和 $\phi$ 角已知，多肽主链的构象就被完全确定。



图2-34 肽基是共面的，因为碳—氮键具有部分双键性质。



刚性单位 刚性单位

图2-35 肽基与两侧 $\alpha$ -碳原子相连的键都有可观的转动自由。

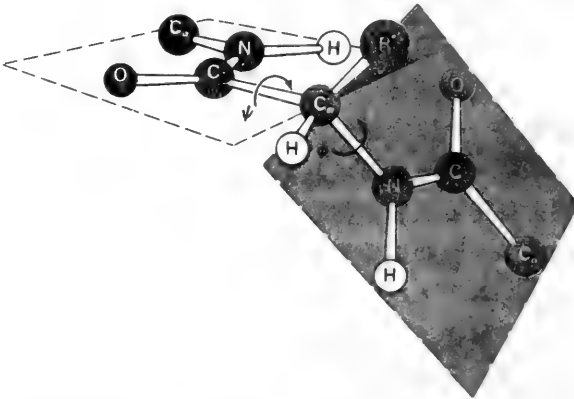


图2-36  $\psi$ 和 $\phi$ 的定义： $\psi$ 代表绕C $\alpha$ —C单键的转动； $\phi$ 代表绕C $\alpha$ —N单键的转动。[依据C. Levinthal, Molecular model building by computer, Copyright © 1966 by Scientific American, Inc.]

### 周期性结构： $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠片和胶原螺旋

一个多肽链能不能折叠成一个规则地重复的结构呢？鲍林 (Pauling) 和科里 (Corey) 通过搭出精确的分子模型来衡量各种多肽构象的可能性。他们坚守从氨基酸和小肽通过实验观

• 埃( $\text{\AA}$ )——一种等于 $10^{-10}$ 米的长度单位。

$1\text{\AA} = 10^{-10}\text{m} = 10^{-8}\text{cm} = 10^{-4}\mu\text{m} = 10^{-1}\text{nm}$

是按光谱学家Anders. J. Angström (1814—1874) 命名的。



测到的键角和键长数据。在1951年，他们提出两个周期性的多肽结构，各称为 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠片。

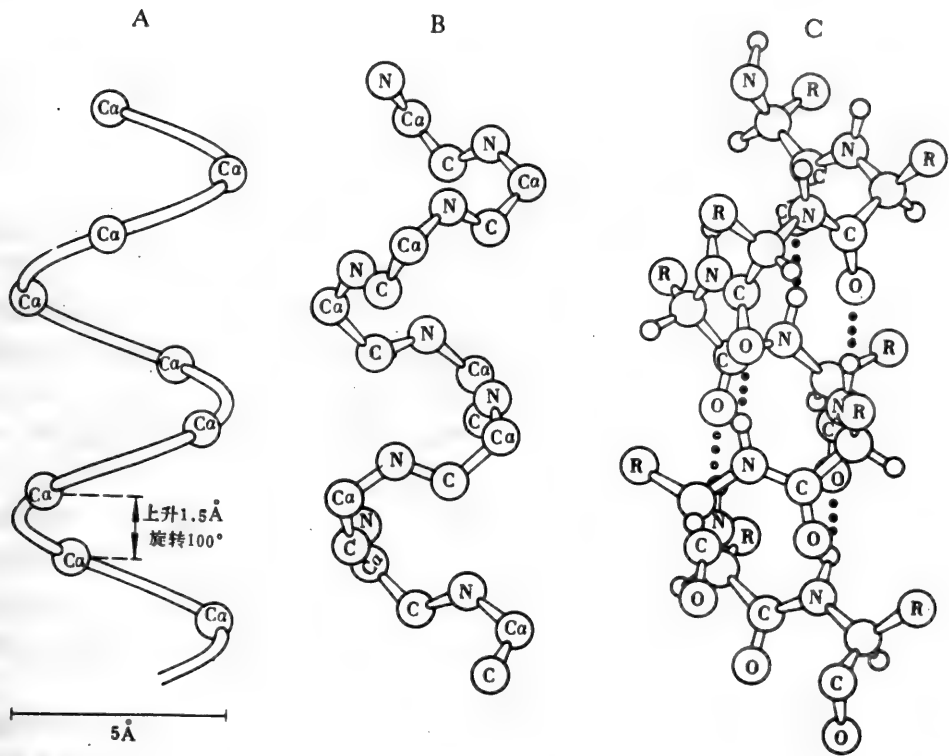


图2-37 右手型 $\alpha$ 螺旋模型：(A)螺旋线上只示出 $\alpha$ -碳原子；(B)只示出骨干氮(N)， $\alpha$ 碳( $Ca$ )和羰基碳(C)原子；(C)整个螺旋。NH与CO基间的氢键(在分图C中用三点线...来表示)稳定了螺旋。

$\alpha$ 螺旋是一个棒状结构。紧密卷曲的多肽主链形成棒的内部，而侧链以螺旋式的排布向外伸展(图2-37和2-38)。 $\alpha$ 螺旋因主链内NH和CO基之间形成链内氢键而趋于稳定。每个

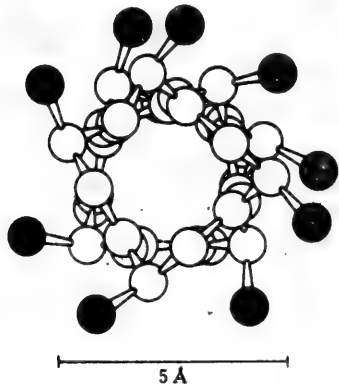


图2-38  $\alpha$ 螺旋的截面图。注意侧链(深灰色)在螺旋的外侧 原子的范德瓦耳半径要比这里示出的大；从而螺旋内部几乎没有空隙了。

个氨基酸的CO基以氢键与另一个氨基酸的NH相结合，而后一个氨基酸，如主链上顺序从前一个氨基酸数起，是第五个氨基酸(图2-39)。因此，所有主链上的CO和NH都结成氢键。每个残基相对于另一个邻接的残基正好按螺旋轴平移1.5 Å 和旋转

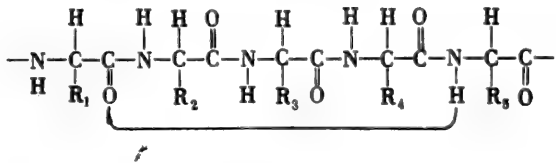


图2-39 在 $\alpha$ 螺旋中第 $n$ 个残基的NH基与第 $(n+4)$ 个残基的CO基形成氢键

100°, 这相当于螺旋的每一周含3.6个残基。这样, 在 $\alpha$ 螺旋中按主链顺序相隔三个和四个氨基酸的两个残基在空间位置上是比较接近的。相反, 相隔两个氨基酸的残基正好在螺旋中遥遥相对, 从而很难接触。 $\alpha$ 螺旋的螺距为5.4Å, 即为平移量(1.5Å)与每周残基数(3.6)的乘积。一个螺旋的方向可以分为右手型(顺时针)或左手型(反时针)两种; 蛋白质中找到的 $\alpha$ 螺旋都属于右手型。

“当我们考虑到表皮、角蛋白组织、主肌肉蛋白、肌球蛋白以及血液的血纤蛋白原中的纤维蛋白都来自同一特殊形态的分子, 从而很可能是一个同根想法的改编本, 我们似乎瞥见了生物分子大家族中伟大的协调事实之一。”(K.Bailey, W.T.Astbury, 和K.M.Rudall, *Nature*, 1943.)

在蛋白质的已知三维结构中 $\alpha$ 螺旋的含量是变化不定的。在有些蛋白质, 如肌红蛋白和血红蛋白中,  $\alpha$ 螺旋是一个主要的结构重复单元。其他蛋白质, 象糜蛋白酶这样的消化酶, 几乎没有 $\alpha$ 螺旋。上面谈到的单链 $\alpha$ 螺旋通常是一个较短的棒状物, 长度往往不到40Å。 $\alpha$ 螺旋主题的一个变异是用来构成长达1000Å以上的棒状物。两个或更多的 $\alpha$ 螺旋可以互相卷曲形成一个缆。这样的 $\alpha$ 螺旋的盘绕卷曲出来的缆存在于若干种蛋白质中: 头发中的角蛋白, 肌肉中的肌球蛋白和原肌球蛋白, 皮肤中的表皮蛋白以及血液凝块中的血纤蛋白。这些蛋白

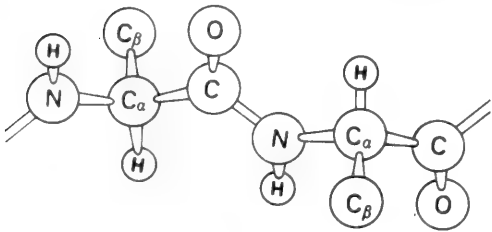


图2-40 在 $\beta$ 折叠片中一个二肽单位的构象 多肽链近乎完全伸展。

中的螺旋缆在形成坚硬的纤维束中起着提供力学强度的作用。

鲍林(Pauling)和科里(Corey)提出 $\alpha$ 螺旋结构是在x射线衍射测出肌红蛋白结构六年之前。阐明 $\alpha$ 螺旋的结构在分子生物学中是一个里程碑, 因为它给人们启示: 一个多肽链的构

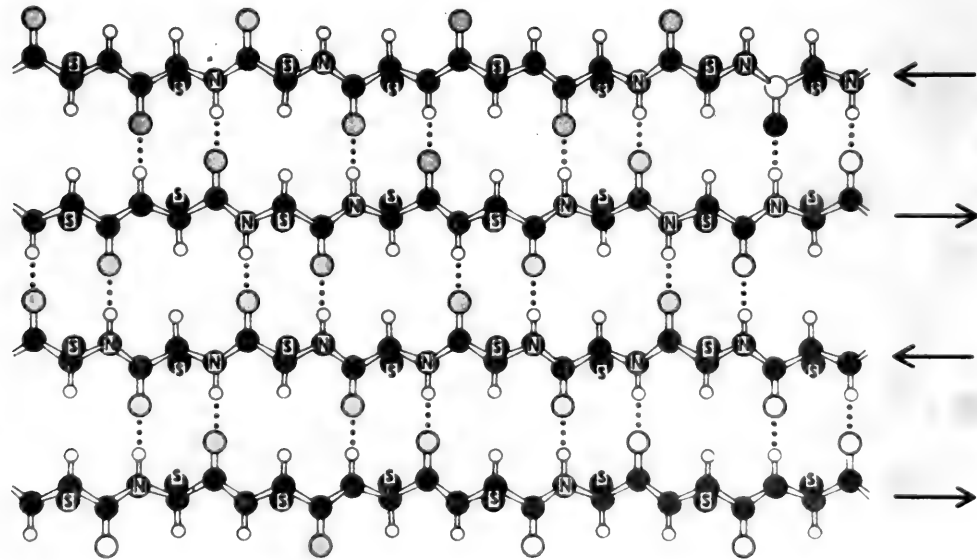


图2-41 反平行 $\beta$ 折叠片 相邻两条链的走向相反 相邻的链中的NH和CO基之间所成的氢键使结构趋于稳定。侧链(用S示出)位于折叠片平面的上方和下方。

象，在确切了解形成它的组分的性质后，是推测得出来的。

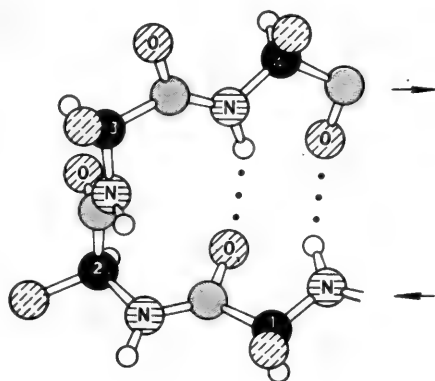
同一年鲍林和科里发现另一个周期性结构的重复基元，命名为 $\beta$ 折叠片（因为这是他们继 $\alpha$ 螺旋以后阐明的第二个结构，故冠以 $\beta$ ）。 $\beta$ 折叠片与 $\alpha$ 螺旋的明显差别在于它是一个片状物，而非一棒状物。在 $\beta$ 折叠片中多肽链几乎是完全伸展的（图2-40），并不象在 $\alpha$ 螺旋中那样卷曲得很紧凑。相邻两个氨基酸的轴向距离为 $3.5\text{\AA}$ ，而在 $\alpha$ 螺旋中为 $1.5\text{\AA}$ 。另外一个差别在于 $\beta$ 折叠片是被不同多肽链中NH和CO基形成的链间氢键所稳定的，而在 $\alpha$ 螺旋中氢键形成于同一个多肽链中的NH和CO基。在 $\beta$ 折叠片中相邻的两条链既可以是走向相同的（平行 $\beta$ 折叠片），也可以是相反的（反平行 $\beta$ 折叠片）。例如，丝纤蛋白几乎全部由堆积起来的反平行 $\beta$ 折叠片组成（图2-41）。这样的 $\beta$ 片区域在很多蛋白质中是一种重复的结构基元。由二至五条平行或反平行的 $\beta$ 链组成的结构单位最为普遍。

胶原螺旋是第三种周期性结构，将在第9章中仔细讨论。这个特殊结构是要对胶原的高抗张强度负责，而胶原为皮肤、骨骼和肌键的主要组分。

### 多肽链可以通过 $\beta$ 转折扭转走向

大多数蛋白质具有密集的球形。这是由于它们的多肽链可以不时扭转走向。很多蛋白质三维结构的分析曾指出，多肽链走向的扭转大都通过同一个称为 $\beta$ 转折的结构要素来完成的。这个发夹式转折的要领在于多肽链中残基 $n$ 的CO基与残基 $(n+3)$ 的NH基形成氢键（图2-42）。因此，一个多肽链可以急剧地扭转它的走向。

图2-42  $\beta$ 转折的结构。这里示出四肽的残基1的CO基与残基4的NH基形成氢键，从而得出一个发夹式的转折。



### 蛋白质建筑中的结构层次

在讨论蛋白质建筑时，可以方便地谈到结构的四个层次。一级结构就是氨基酸顺序以及二硫桥的位置，如果后者存在的话。一级结构从而是关于蛋白质中共价键连接的全部情况。二级结构涉及按线性顺序来说互相接近的氨基酸残基的空间关系。这些空间关系中有的是很有规则的，产生了周期性结构。 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠片和胶原螺旋都是二级结构的实例。三级结构涉及那些按线性顺序来说相隔较远的氨基酸残基之间的空间关系。必须注意，二级结构与三级结构之间的分界线是人为的。包含一条多肽链以上的蛋白质在结构组织上表现出一个新的层次，即四级结构。它涉及这些多肽链安装在一起的方式。在这样的蛋白质中每一条多肽链称为亚基。另一个有用的术语是结构域，它代表蛋白质结构中一个密集的球形单位。很多蛋白质折叠成具有质量从10至20kda1的结构域。较大蛋白质的几个结构域通常由多肽链中较

易变动的区域所连接。

氨基酸顺序规定三维结构

对蛋白质的氨基酸顺序与它构象之间关系的深入了解来自安芬森, C. (Christian Anfinsen) 关于核糖核酸酶的工作。核糖核酸酶是水解RNA的酶。它是一个由124个氨基酸残基组成的单个多肽链 (图2-43)。它包含四个二硫键, 后者可被过甲酸不可逆地氧化为磺基丙氨酸残

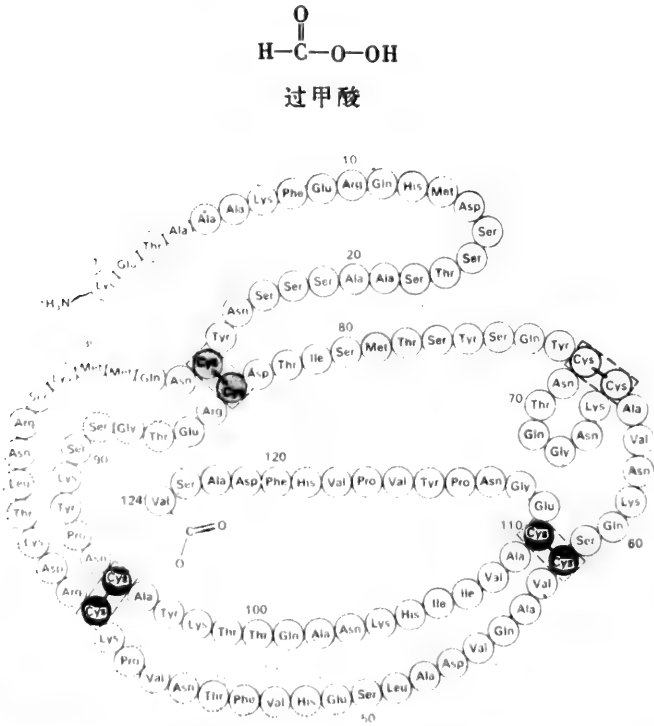
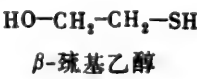


图2-43 牛核糖核酸酶的氨基酸顺序 四个二硫键用虚线框示出。 [依据C. H. W. Hirs, S. Moore和W. H. Stein. *J. Biol. Chem.* 235 (1960) : 633. ]

基 (图2-32)。此外, 这些二硫键也可以应用象β-巯基乙醇这样的试剂来还原, 使它可逆地



裂解, 生成带有半胱氨酸侧链的部分还原的二硫化物 (图2-44)。在过量β-巯基乙醇存在的条件下部分还原的二硫化物也被还原, 而最后给出的产物为一个蛋白质, 其中二硫化物 (胱氨酸) 已被完全还原为硫化物 (半胱氨酸)。但被发现, 核糖核酸酶, 如果没有被脲或盐



酸胍这样的变性剂把折叠的链松开一些的话，就不易在37℃和 pH 7下被β-巯基乙醇还原。

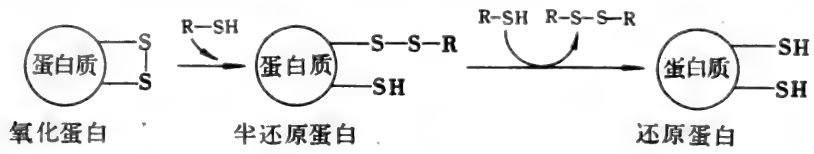


图2-44 蛋白质中二硫键通过过量象β-巯基乙醇这样的硫氢试剂来进行还原。

虽然这些变性剂的作用机理并不完全清楚，它们肯定破坏了非共价性的相互作用。没有交联的多肽链通常在8 mol/L 脲和6 mol/L 盐酸胍中采取一个无规线团构象，这可从粘度和旋光光谱等物理性质中得到佐证。若核糖核酸酶在8 mol/L脲中用β-巯基乙醇处理的话，所得产物为一个完全被还原的无规线团式的多肽链，它并无酶的活性。换言之，核糖核酸酶在这个处理中已被变性（图2-45）。

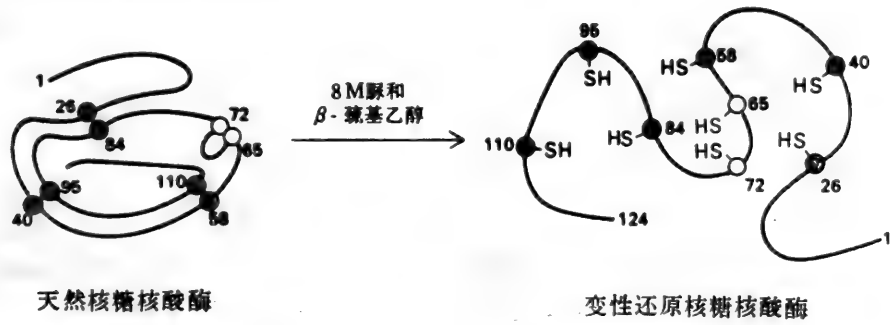


图2-45 核糖核酸酶的还原和变性（M = mol L——编辑注）

安芬森然后进行一个发人深思的观察：变性核糖核酸酶，通过透析除去脲和β-巯基乙醇后，逐渐重新取得酶的活性。他立刻看到了这个偶然的发现的意义：变性酶的巯基在空气中被氧化，并自发地折叠成一个具有催化活性的酶。仔细的研究指出，如果巯基在合适的条件下被氧化的话，原来酶的活性几乎可以全部得到恢复（图2-46）。在所测的全部物理和

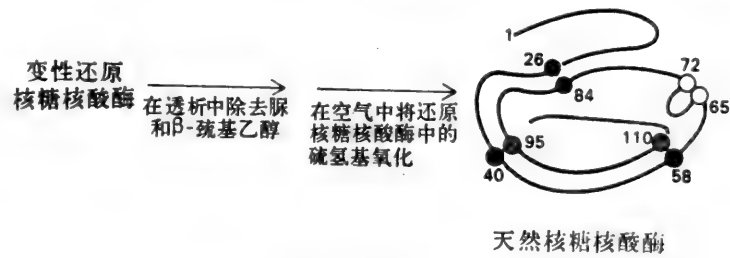


图2-46 核糖核酸酶的复性

化学性质上，重新折叠后的酶与天然的酶几乎完全一致。这些实验说明，规定核糖核酸酶复杂的三维结构所需的信息包含在它的氨基酸顺序中。以后对其他蛋白质的研究证实了这个原理的普遍性。这是一个分子生物学的中心原理：顺序规定构象。

当还原后的核糖核酸酶在 $8\text{mol/L}$ 脲中被重新氧化时，得出的结果很不一样。现在再通过透析将脲除去。核糖核酸酶在这个条件下重新氧化时只恢复原来天然酶活性的 $1\%$ 。为什么这个实验与还原核糖核酸酶在一个无脲的溶液中再被氧化得出的结果如此不同？原因在于当无规线团式的被还原分子重新氧化时二硫化物形成了错误的配对。八个半胱氨酸形成四个二硫化物可以有 $105$ 种不同的方式，而其中只有一种是会给酶活性的。 $104$ 种错误的配对可以形象地称为“搅乱了”的核糖核酸酶。安芬森后来又发现，“搅乱了”的核糖核酸酶在加入痕量 $\beta$ -巯基乙醇到重新氧化的蛋白质中去时，会自发地转化为活性完全的天然核糖核酸酶（图2-47）。加入的 $\beta$ -巯基乙醇可以催化二硫化物配对的重新排列，一直到重新得出天然

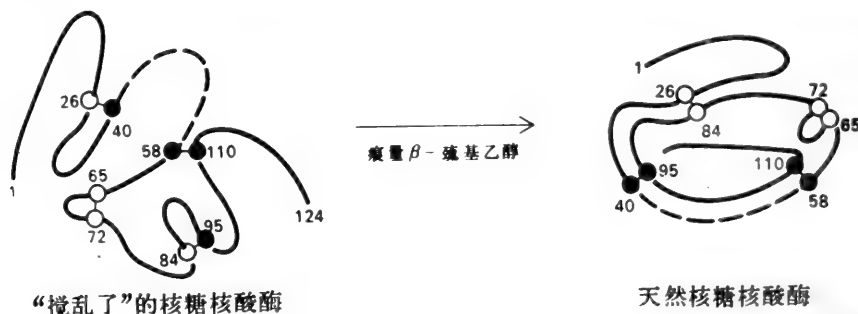


图2-47 存在痕量 $\beta$ -巯基乙醇时，从“搅乱了”的核糖核酸酶形成天然的核糖核酸酶。

结构，这大约需要十小时。当“搅乱了”的构象转化成酶的稳定的天然构象时，整个过程是受自由能的减少所驱使的。因此，核糖核酸酶的天然形式显得是热力学最稳定的结构。

安芬森（Anfinsen）（1964）写道：

近来我想到，人们应该考虑蛋白分子的结构，当它正要折叠成一个精确的几何形体时，正如一行写成二重唱形式的旋律，自然正好设计得使它能折叠回去恢复原状，为与生物功能契合的相互作用产生悦耳的和音。人们可以将此类比有所发展，认为在象我前面提到搅乱了二硫桥的蛋白质中产生的和音是不协调的，但当加入巯基乙醇以给予重组的机会时，它们就会在变调后给出天然分子的和声。究竟能否引出莫扎特（Mozart）的音乐要比舍恩伯格（Schoenberg）的音乐在热力学上更为稳定的结论，这样的问题就要留给读者中的哲学家们了。

## 蛋白质通过 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 线段的缔合进行折叠

相互作用的和音是怎样在一个松散的多肽链折叠成蛋白质的转化中产生的？一种先验的可能性是一切可能的构象都经探索，最后找到一个在能量上最有利的形式。那末这样的随机探索需要多长时间呢？考虑一个较小的蛋白质，具有 $100$ 个残基。假如每个残基可以采取三种不同的构象的话，结构的总数当为 $3^{100}$ ，这等于 $5 \times 10^{47}$ 。如果从一个结构转变到另一个结构需要 $10^{-13}$ 秒的话，总的探索时间将为 $5 \times 10^{47} \times 10^{-13}$ 秒，这等于 $5 \times 10^{34}$ 秒或 $1.6 \times 10^{27}$ 年！应当指出，这个时间是一个最低的估计，因为每个残基可能具有的构象数要比三大，而从一个构象转变到另一个所需的时间很可能要比 $10^{-13}$ 秒长得多。显然，即使一个较小的蛋白质要想在随机探索中历经一切可能的折叠构象来确定一个能量上最好的构象也会嫌费时太久了。

那末, 蛋白质怎样在几秒或几分钟内进行折叠呢? 答案还不清楚, 但有一个讲得通的假设指出, 小段二级结构在折叠过程中充当中间体。根据这个模型, 一个未折叠的多肽链中各个较短的片段 (~15个残基) 晃进晃出于它们天然的 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 片的形式中。这些短暂的结构借扩散而相遇, 并以形成复合体而相互稳定 (图2-48)。例如, 两个 $\alpha$ 螺旋, 两个 $\beta$ 线或一个 $\alpha$ 螺旋和一个 $\beta$ 线可以搞在一起。这些 $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ 和 $\alpha\beta$ 复合体称为折叠单位, 它们作为核心足以稳定其它仍在摇晃中的二级结构组元。有若干条实验证据支持这个模型。首先是多肽链采取一个规则二级结构的倾向在很大程度上取决于它的氨基酸组成。谷氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸和亮氨酸残基有形成 $\alpha$ 螺旋的倾向, 而缬氨酸, 异亮氨酸和酪氨酸残基使形成 $\beta$ 片的机会增加了。其次, 从无规线团向 $\alpha$ 螺旋的转化可以在一微秒之内完成。因此, 小段二级结构形成得很快。第三, 上述假设的折叠单位 ( $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ 和 $\alpha\beta$ 复合体) 实际上就是蛋白质结构中的主要组元。现在需要迎接的挑战是直接检测和鉴定折叠过程中那些短暂的中间体, 并重现能赋予多肽链形态和功能的途径。

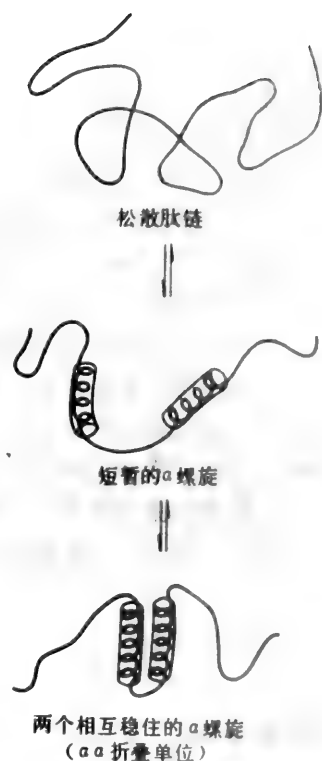


图2 48 蛋白质折叠过程中假设的步骤  
未折叠多肽链的两个片段在一瞬间成为 $\alpha$ 螺旋。这些螺旋靠形成一个复合体而趋于稳定

## 概 要

蛋白质几乎在所有生物学过程中起着关键作用。一切酶都是蛋白质, 它们在生物体系中起着化学反应催化剂的作用。因此, 蛋白质决定细胞中化学转化的模式。蛋白质还是诸如运载和贮存、协调运动、机械支持、免疫保护、兴奋作用以及生长和分化的控制等一系列功能的媒介。

蛋白质的基本结构单位是氨基酸。从细菌到人类所有物种中的蛋白质都由同一组20种氨基酸构成。这些构造单元的侧链具有不同的大小、形状、电荷、形成氢键的能力以及化学活性。它们可以这样分组: (a) 脂肪侧链——甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和脯氨酸; (b) 羟基脂肪侧链——丝氨酸和苏氨酸; (c) 芳香侧链——苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; (d) 碱性侧链——赖氨酸、精氨酸和组氨酸; (e) 酸性侧链——天冬氨酸和谷氨酸; (f) 酰胺侧链——天冬酰胺和谷氨酰胺; 以及 (g) 硫侧链——半胱氨酸和甲硫氨酸。

很多氨基酸, 通常超过 100 个, 可以通过肽键相连, 形成多肽链。肽键连接一个氨基酸的 $\alpha$ -羧基和下一个氨基酸的 $\alpha$ 氨基。在有些蛋白质中, 少数侧链通过二硫键形成交联, 而



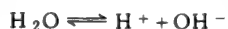
这是氧化半胱氨酸残基造成的。一个蛋白质由一个或更多多肽链所组成。每一种蛋白质都有其独特的氨基酸顺序，而这是遗传决定的。蛋白质的氨基酸顺序可以按下面的方法揭示。首先，蛋白质的氨基酸组成可以通过其酸水解产物的离子交换色层分析来测定。氨基末端残基可以通过一种象丹磺酰氯这样的端基试剂来予以鉴定。其次，蛋白质将被专一性地裂解成小肽。例如，胰蛋白酶水解蛋白质于赖氨酸和精氨酸残基的羧基侧。第三，然后用依次脱落氨基末端残基的Edman方法来测定这些小肽的氨基酸顺序。最后，小肽之间的次序可以从交叠肽段的氨基酸顺序中得出。

决定蛋白质生物功能的关键是它的构象，而它代表分子中原子的三维排布方式。多肽链已知有三种规则地重复的构象： $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠片和胶原螺旋。 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠片的较短的片段可在很多蛋白质中找到。象首先在核糖核酸酶中显示的那样，有一个这样的重要原理：蛋白质的氨基酸顺序规定它的三维结构。如果除去巯基乙醇和脲后在空气中氧化时，被还原的、松散的核糖核酸酶的多肽链能自发地形成正确无误的二硫配对，并重新取得全部酶活性。蛋白质的折叠是通过短暂地纳入 $\alpha$ 螺旋或 $\beta$ 片形体中的短小肽段的缔合来进行的。

## 附录：酸-碱概念

### 水的电离

水离解为水合氢离子( $\text{H}_3\text{O}^+$ )和羟基( $\text{OH}^-$ )离子。我们在反应式中把水合氢离子简化为氢离子( $\text{H}^+$ )，并把平衡式写成



这个离解的平衡常数 $K_{\text{aq}}$ 为

$$K_{\text{aq}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-] / [\text{H}_2\text{O}] \quad (1)$$

其中用方括号表示有关组分的摩尔浓度。鉴于水的浓度( $55.5 \text{ mol/L}$ )在电离中很少变化，(1)式可以简化为

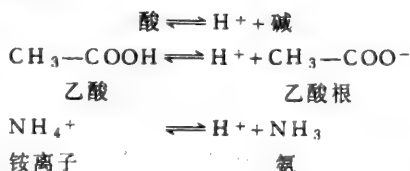
$$K_{\text{w}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \quad (2)$$

其中 $K_{\text{w}}$ 为水的离子积。在 $25^\circ\text{C}$ ， $K_{\text{w}}$ 为 $1.0 \times 10^{-14}$ 。

应予指出， $\text{H}^+$ 和 $\text{OH}^-$ 的浓度是互相成反比地联系着的。若 $\text{H}^+$ 的浓度高了，那末 $\text{OH}^-$ 的浓度将下降；反之亦然。例如，若 $[\text{H}^+] = 10^{-2} \text{ mol/L}$ ，则 $[\text{OH}^-] = 10^{-12} \text{ mol/L}$ 。

### 酸和碱的定义

酸为质子供体。碱为质子受体。



酸电离中形成它的共轭碱。相反，碱的质子化也给出其共轭酸。乙酸和乙酸根离子是一对共轭的酸-碱。

### pH 和 pK 的定义

溶液的 pH 是它的 $\text{H}^+$ 浓度的量度。pH 定义为

$$\text{pH} = \log_{10}(1/[\text{H}^+]) = -\log_{10}[\text{H}^+] \quad (3)$$



值也与上述二数相仿。有些氨基酸如天冬氨酸, 还含有一个可以电离的侧链。氨基酸中可以电离的侧链的  $pK$  值可以从3.9 (天冬氨酸) 变化到12.5 (精氨酸)。

表2-3 若干氨基酸的  $pK$  值

氨基酸	$pK$ 值 (25°C)			氨基酸	$pK$ 值 (25°C)		
	$\alpha$ -COOH 基	$\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> 基	侧链		$\alpha$ -COOH 基	$\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> 基	侧链
丙氨酸	2.3	9.9		谷氨酸	2.2	9.7	4.3
甘氨酸	2.4	9.8		组氨酸	1.8	9.2	6.0
苯丙氨酸	1.8	9.1		半胱氨酸	1.8	10.8	8.3
丝氨酸	2.1	9.2		酪氨酸	2.2	9.1	10.9
缬氨酸	2.3	9.6		赖氨酸	2.2	9.2	10.8
天冬氨酸	2.0	10.0	3.9	精氨酸	1.8	9.0	12.5

依据 J. T. Edsall and J. Wyman, *Biophysical Chemistry* (Academic Press, 1958), ch. 8.

习 题

1. 下列试剂常被用于蛋白质化学:
- |               |             |
|---------------|-------------|
| CNBr          | 丹磺酰氯        |
| 脲             | 6 mol/L HCl |
| $\beta$ -巯基乙醇 | 水合茚三酮       |
| 胰蛋白酶          | 异硫氰酸苯酯      |
| 过甲酸           | 糜蛋白酶        |
- 其中哪一个最适合于完成下列任务?
- (a) 测定小肽的氨基酸顺序。
  - (b) 鉴定肽的氨基末端残基 (你拿到的那个肽的量不到  $10^{-7}$  g)。
  - (c) 不含二硫键的蛋白质的可逆变性。若有二硫键存在时还需加什么试剂?
  - (d) 在芳香残基的羧基一侧水解肽键。
  - (e) 在甲硫氨酸的羧基一侧裂解肽键。
  - (f) 在赖氨酸和精氨酸残基的羧基一侧水解肽键。
2. 下列各溶液的 pH 值是多少?
- (a)  $10^{-3}$  mol/L HCl。
  - (b)  $10^{-2}$  mol/L NaOH。
  - (c) 0.1 mol/L 乙酸和 0.03 mol/L 乙酸钠溶液的等体积混合液。
  - (d) 0.1 mol/L 甘氨酸和 0.05 mol/L NaOH 的等体积混合液。
  - (e) 0.1 mol/L 甘氨酸和 0.05 mol/L HCl 的等体积混合液。
3. 一种酸的  $pK$  为 6, 当 pH 为 4、5、6、7 和 8 时的碱/酸比各为多少?
4. 原肌球蛋白为一种肌肉蛋白质。它是一个双股的  $\alpha$  螺旋的盘绕卷曲。蛋白质的质量为 70 kdal。平均残基的质量约为 110 dal。分子有多长?
5. 无水肼曾用于裂解蛋白质中的肽键。反应产物有哪些? 如何可使这个方法用于鉴定羧基末端氨基酸?
6. 一种多肽激素, 促肾上腺皮质激素的氨基酸顺序为
- Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-  
Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-  
Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-Gln-  
Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

(a) 这个分子在 pH 7 时净电荷约为多少? 假设其侧链的 pH 值给出于表 2-3 (本书 30 页), 以及末端  $\text{—NH}_3^+$  和  $\text{—COOH}$  基的  $pK$  值各为 7.8 和 3.6。

(b) 这个激素用溴化氰处理后可得出多少个肽?

7. 次乙基亚胺与蛋白质中的半胱氨酸侧链反应形成  $S$ -氨基衍生物。在这些修饰过的半胱氨酸残基的羧基端一侧的肽键是对胰蛋白酶的水解很敏感的。为什么?
8. 一种能催化二硫化物-硫氢基交换反应的酶已被分离。无活性的“搅乱了”的核糖核酸酶被这个酶很快地转化为有酶活性的核糖核酸酶。相反, 胰岛素被这种酶失去活性, 这个重要观察在胰岛素的氨基酸顺序和三维结构之间的关系上意味着什么?

另外的习题参看 W.B. Wood, J.H. Wilson, R.M. Benbow, and L.E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 2; 和 R. Montgomery and C.A. Swenson, *Quantitative Problems in the Biochemical Sciences*, 2nd ed. (Freeman, 1976), chs. 6, 7, and 8.

### 第 3 章 氧的运载体：肌红蛋白和血红蛋白

从厌氧生物转变到好氧生物，是在进化中重大的一步，因为它揭开了一个丰富的能库。在有氧条件下从葡萄糖中提取的能量为无氧条件下的18倍。脊椎动物已经演化出两种主要机制来为它们的细胞供应连续和充足的氧。第一是循环系统，它为细胞积极地送氧。如果没有循环系统，好氧生物的大小只能限制在 1 mm 上下，因为氧靠扩散越过较大距离需时太久，难于满足细胞的要求。第二个主要的适应措施是利用**载氧分子**来克服在水中溶解度太低所受的限制。在脊椎动物中氧载体为**血红蛋白**和**肌红蛋白**这样的蛋白质。血红蛋白包含在红血细胞中，在血液中起着氧载体的作用。血红蛋白的存在使一升血液运载氧的容量从5 ml提高到250ml。血红蛋白也在运载二氧化碳和氢离子中起着重要作用。肌红蛋白位于肌肉中，起着贮氧的作用，并便利氧在肌肉中的移动。

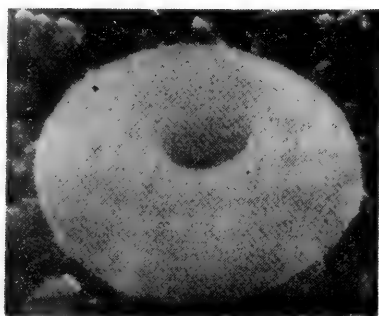
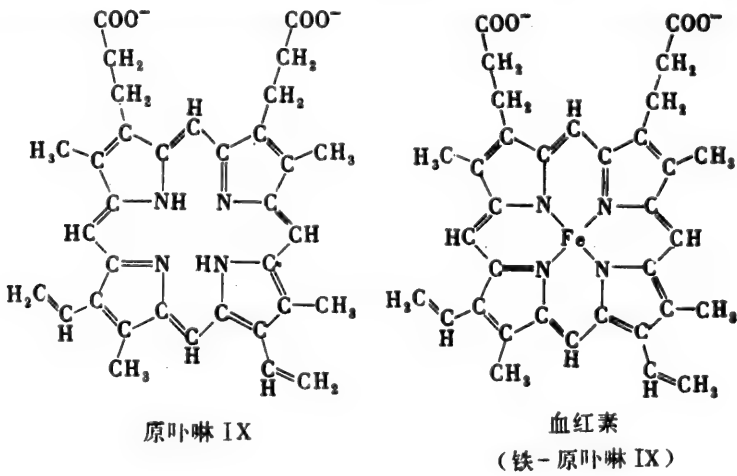


图 3-1 红细胞的扫描电子显微照片。[蒙 Dr. Mark Goldman and Dr. Robert Leif 特许。]

#### 氧与一个血红素辅基结合

肌红蛋白或血红蛋白结合氧的容量有赖于一个非多肽单位，即**血红素基**的存在。血红素



也使肌红蛋白和血红蛋白取得独特的颜色。诚然，很多蛋白质需要结合得很牢的特定非多肽单位以取得生物学活性。这样的单位称为**辅基**。一个蛋白质脱去它的特征性辅基后称为**脱辅基蛋白**。

血红素系由一个有机部分和一个铁原子组成。有机部分，**原卟啉**，系由四个吡咯基构成。四个吡咯由次甲基桥联接后形成一个四吡咯环。四个甲基、两个乙烯基和两个丙酸侧链与这个四吡咯环相连。这些取代基可以有十五种不同的连法。而只有其中的一种，称为**原卟啉 IX**，存在于生物体系中。

铁原子在血红素中与原卟啉环中心的四个氮相结合(图3-2和3-3)。铁还能形成两个键，

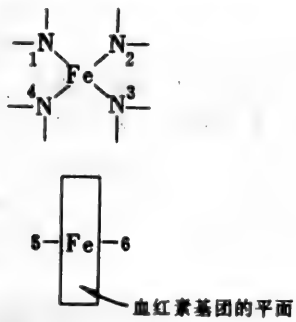


图 3 -2 血红素中的铁原子能形成六个键。其中四个在血红素的平面内。第五键在这个平面的一侧，而第六键则在另一侧。这些结合上去的原子所占的地位有时称为**配位位置**。

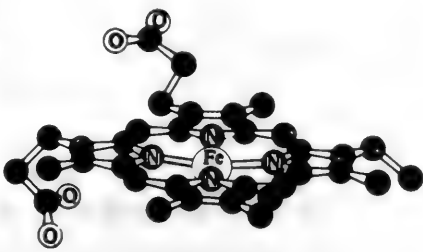


图 3 -3 肌红蛋白中的血红素基团

分别在血红素平面的两侧。这些结合部位称为**第五和第六配位位置**。血红素中的铁原子可以处在亚铁(+2)或高铁(+3)两种不同的氧化态。相应的血红蛋白各称为**亚铁血红蛋白**和**高铁血红蛋白**。高铁血红蛋白又称为**正铁血红蛋白**。只有亚铁血红蛋白，+2氧化态，才能结合氧。同样的命名适用于肌红蛋白。

### x射线晶体学在原子水平上揭示三维结构

肌红蛋白和血红蛋白的三维结构分别为肯德罗，J. (John Kendrew) 和佩鲁茨，M. (Max Perutz)所阐明，这是分子生物学中的里程碑。这些研究到五十年代末取得了成果，并证明，x射线晶体学可以揭示象蛋白质这样的大分子的结构。在1957年前解出的最大结构为维生素B<sub>12</sub>，它比肌红蛋白 (17.8kda) 和血红蛋白 (66kda) 要小一个数量级。测定这些蛋白质的三维结构是对蛋白质晶体学的一个很大的激励。现在知其三维结构较详的蛋白质已超过五十个，而为很多其他蛋白质阐明其结构的工作正在进展中。x射线晶体学正在为我们理解

蛋白质结构和功能作出重大贡献,因为这是唯一能揭示蛋白质中大多数原子空间位置的方法。电子显微镜能对生物大分子的结构给出很多信息,但这个方法尚未达到在分子构造中划分出原子的细度。

在转向肌红蛋白和血红蛋白的三维结构之前,让我们考虑一下x射线晶体学方法的某些基本方面。首先,需要蛋白质晶体。肌红蛋白,作为实例,是在它的浓溶液中加入硫酸铵后给出晶体的(图3-4)。硫酸铵在3 mol/L浓度下使肌红蛋白的溶解度大为减小,并导致其结

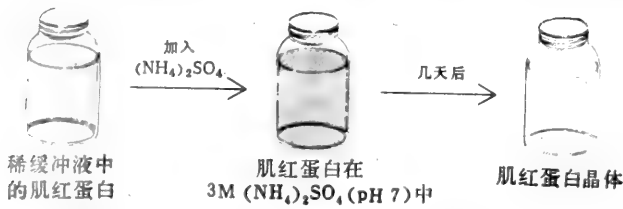


图3-4 肌红蛋白的结晶。

晶。大多数蛋白质的溶解度在加入高浓度的任何盐溶液后趋于减小。这个效应称为盐析。肌红蛋白这样给出的晶体可以长几个毫米(图3-5)。

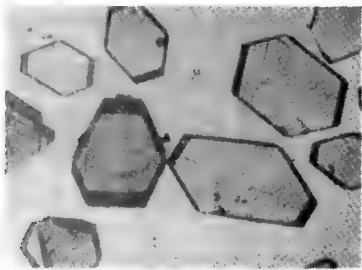


图3-5 肌红蛋白晶体的照片。[蒙Dr. John Kendrew 特许。]

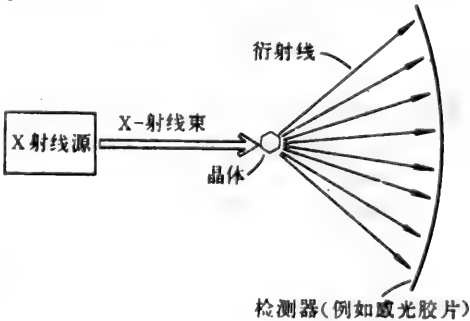


图3-6 x射线晶体学实验的要素: x射线束、晶体和检测器。

x射线晶体学实验的三个组成部分为x射线光源,蛋白质晶体和检测器(图3-6)。波长为1.54Å的x射线束是将加速飞驰的电子打在铜靶上产生的。一束狭小的x射线照在蛋白质晶体上。一部分射线通过晶体而未改变方向。其余的射线被散射到一系列方向上。散射(或衍射)线束可用感光胶片检测,乳胶的黑度是与散射线束的强度成正比的。这个方法的基本物理原理为:

1. 电子散射x射线。原子散射出来的波的振幅与它的电子数成正比。因此,碳原子的散射能力为氢原子的六倍。
2. 散射波重新组合。每个原子都对每个散射线束作出贡献。散射波若周相一致时互相加强,而周相相反时互相抵销。
3. 散射波重组的方式只取决于原子的排布。



## x射线研究肌红蛋白的步骤

肯德罗选择肌红蛋白进行x射线分析有几个理由：它是一个较小的蛋白（17.8kda），它较易结晶并制出足够的数量。此外，肌红蛋白还有一个好处，即与肯德罗的同事佩鲁茨早已研究的血红蛋白有密切联系。选定抹香鲸的骨骼肌肉来提取肌红蛋白的原因，是由于它稳定，并形成出色的晶体。潜水哺乳动物，如鲸、海豹和海豚特别富有肌红蛋白，它起到为潜水而贮氧的作用。

肌红蛋白晶体装在一个毛细管中，并以精确的取向对x射线和感光片定位。晶体的进动给出x射线照相，其中衍射斑点规则地排列成阵列。图3-7示出的x射线照相是在三维斑点阵列中的一个二维截面。肌红蛋白给出这样的斑点25,000个。每个斑点的强度要测量。这些

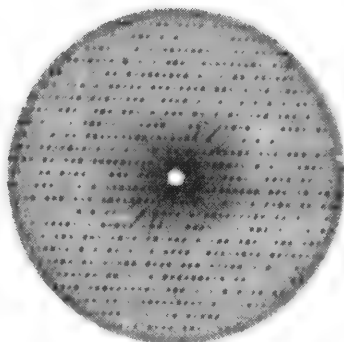


图3-7 肌红蛋白晶体的x射线进动照相。

强度是x射线晶体分析的基本实验数据。

下一步是从观察到的强度中为肌红蛋白造象。这要通过一个称为傅里叶（Fourier）级数的数学关系来完成，而这个级数是正弦和余弦项的加和。但是，肌红蛋白晶体的散射强度只为计算傅氏级数提供了一部分所需的信息。所缺的必要数据，即散射束的周相，要从大分子的一、二个部位上含有象铀和铅这样的重原子的肌红蛋白晶体给出的完整衍射数据中得出。现在可以进入用高速计算机计算电子密度图的阶段了。很幸运，高速而具有较大贮存容量的计算机的发展正好跟得上肌红蛋白的工作需要。为肌红蛋白进行的最后一轮傅氏合成大约包含十亿个项。

富氏合成成为大量规则地分布在晶体中的点给出了电子密度。这三维电子密度分布是通过一组平行的一个接一个的截面表示出来的。每一个截面是一块透明塑料板，其中电子密度分布是用等价线示出的（图3-8）。表示电子密度的方式很象应用等高线在地质勘测图上表示高度那样（图3-9）。再下一步是解释电子密度图。一个关键因素是x射线分析的分辨能力，这决定于傅氏合成中所用散射强度的数目。象的真实程度取决于傅氏合成的分辨情况，正如图3-10中光学类比示出的那样。肌红蛋白的分析是分三个阶段来进行的。第一阶段完成于1957年，只用了衍射花样中最中间的400个斑点，相当于6Å的分辨率。不久将看到，这个低分辨率电子密度图揭示了多肽链的走向，其它结构细节就说不上了。原因在于多肽链捆装在一起，



图3-8 肌红蛋白电子密度图示出血红素的截面。截面中心的峰相当于铁原子的位置。[引自J. G. Kendrew, *The three-dimensional structure of a protein molecule*, Copyright © 1961 by Scientific American, Inc.,]

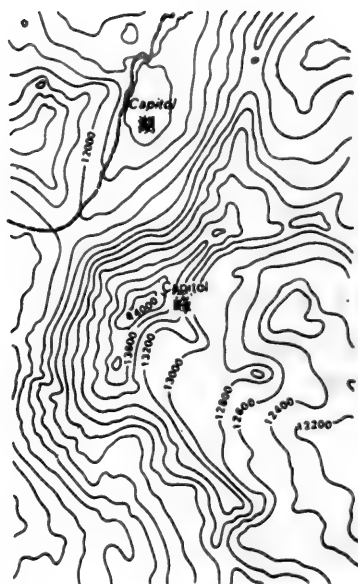


图3-9 从美国地质勘测图得出的截面。

它们中心之间相隔5到10 $\text{\AA}$ 。要划分出分隔2.8—4.0 $\text{\AA}$ 的原子基团以及分隔1.0—1.5 $\text{\AA}$ 的个别原子，就需要较高分辨率的图了。为肌红蛋白得出这样的图中，有在1959年取得的分辨率

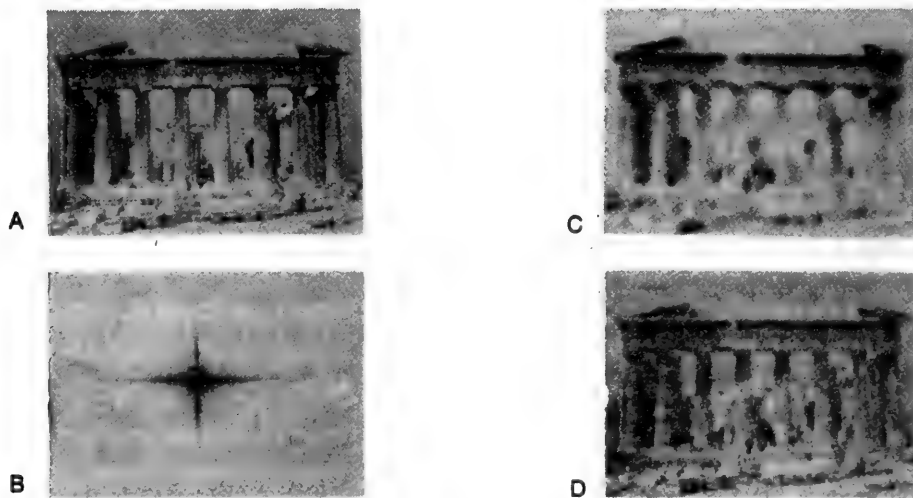


图3-10 分辨率对成像质量的效应，以光学类比x射线衍射来示出：(A)巴台农神庙(祭雅典娜女神的神庙)；(B)巴台农神庙的衍射花样；(C和D)是从B中花样重建的象。得D时比C用了较多数据，故而D中象的质量较高。[载Dr. Thomas Steitz (part A) and Dr. David De Rosier (part B) 特许。]

为 $2\text{\AA}$  (10,000个强度) 的图, 而1962年取得的图分辨率为 $1.4\text{\AA}$  (25,000个强度)。一个x射线分析的最后分辨率决定于晶体的完整程度。对蛋白质来说, 分辨率的上限一般在 $2\text{\AA}$  上下。

1957年肯德罗和他的同事们看到了过去没有人看到过的东西; 为一个蛋白质给出了代表全部复杂性的三维图象。从他们 $6\text{\AA}$  傅氏合成中引出的模型包含一组高密度棒形区, 它的大小正好与设想的多肽链相近 (图3-11)。分子显得十分紧密。进一步的考查指出, 分子系由一组复杂而交织的棒形体组成, 后者笔直走一段后又拐成一个折角, 然后又在另一方向再走一段。定位血红素的铁原子更不成问题, 因为它比结构中任何其他原子包含的电子多了很多。这种分子的最令人注意的特点是它的不规则性和完全缺乏对称性。

### 肌红蛋白有紧密的结构和高含量的 $\alpha$ 螺旋

两年后为肌红蛋白得出的高分辨率电子密度图包含了丰富的结构细节。1260个非氢原子中有1200个已被明显地确定了位置, 精度达到 $0.3\text{\AA}$  以内。主链的走向和血红素基的位置示出于图3-12中。肌红蛋白的几个重要特点为:

1. 肌红蛋白极为紧密。总体的尺寸约为 $45 \times 35 \times 25\text{\AA}$ 。内部很少空隙。
2. 约有75%的主链折叠成 $\alpha$ 螺旋构象。全部 $\alpha$ 螺旋是右手型的。共有八段主要的螺旋, 各为A、B、C、...、H。



图3-11 肌红蛋白的低分辨率模型。[蒙 Dr. John Kendrew 特许。]

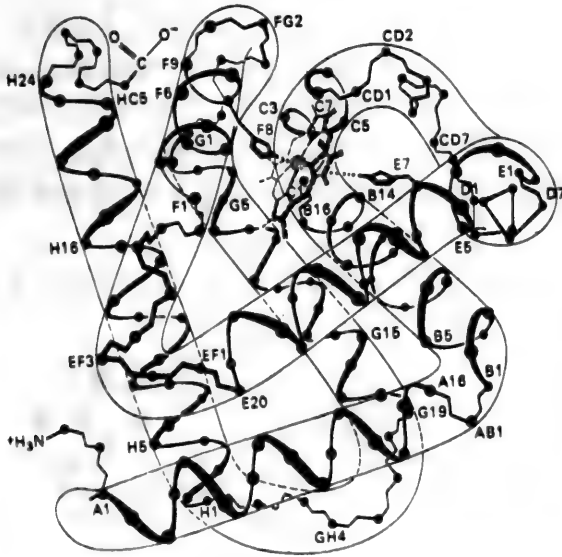


图3-12 肌红蛋白的高分辨率模型。只示出 $\alpha$ -碳原子。血红素基以灰色示出。[依据R. E. Dickerson, In *The Proteins*, H. Neurath, ed., 2nd ed., vol. 2 (Academic Press, 1964), p. 634.]

螺旋A中的第一个残基用A1来表示, 第二个为A2, 等等 (图3-13)。螺旋区之间有五个非螺旋段 (在螺旋C和D之间的一段命名为C D)。还有两个非螺旋区: 氨基末端的两个残基 (命名为NA1和NA2) 和羧基末端的五个残基 (命名为HC1至HC5)。

3. 并非所有使螺旋段终止的因素都为已知。其中一个重要因素是脯氨酸残基的出现。脯氨酸并不能容纳在一个 $\alpha$ 螺旋之中 (除非在其两端)。吡咯烷酮五员环就不能凑合到一段笔直的 $\alpha$ 螺旋中去。肌红蛋白中只有四个脯氨酸, 但有八个螺旋的终端。很清楚, 还有其他因素起着作用。例如, 丝氨酸或苏氨酸的OH基有时会与主链的羰基

Val-Leu-Ser-Glu-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu-Val-	10
NA1 NA2 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8	
Leu-His-Val-Trp-Ala-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-	20
A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18	
Val-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Asp-Ile-Leu-Ile-	30
B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11	
Arg-Leu-Phe-Lys-Ser-His-Pro-Glu-Thr-Leu-	40
B12 B13 B14 B15 B16 C1 C2 C3 C4 C5	
Glu-Lys-Phe-Asp-Arg-Phe-Lys-His-Leu-Lys-	50
C6 C7 CD1 CD2 CD3 CD4 CD5 CD6 CD7 CD8	
Thr-Glu-Ala-Glu-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-	60
D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 E1 E2 E3	
Leu-Lys-Lys-His-Gly-Val-Thr-Val-Leu-Thr-	70
E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13	
Ala-Leu-Gly-Ala-Ile-Leu-Lys-Lys-Lys-Gly-	80
E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 EF1 EF2 EF3	
His-His-Glu-Ala-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Ala-	90
EF4 EF5 EF6 EF7 EF8 F1 F2 F3 F4 F5	
Gln-Ser-His-Ala-Thr-Lys-His-Lys-Ile-Pro-	100
F6 F7 F8 F9 FG1 FG2 FG3 FG4 FG5 G1	
Ile-Lys-Tyr-Leu-Glu-Phe-Ile-Ser-Glu-Ala-	110
G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11	
Ile-Ile-His-Val-Leu-His-Ser-Arg-His-Pro-	120
G12 G13 G14 G15 G16 G17 G18 G19 GH1 GH2	
Gly-Asn-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Gln-Gly-Ala-	130
GH3 GH4 GH5 GH6 H1 H2 H3 H4 H5 H6	
Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-Lys-	140
H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16	
Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-	150
H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 HC1 HC2	
Tyr-Gln-Gly	153
HC3 HC4 HC5	

图3-13 抹香鲸肌红蛋白的氨基酸顺序。顺序中每个残基下面的标记示出它在 $\alpha$ 螺旋区或非螺旋区中的位置。例如，B4是B螺旋中第四个残基；EF7是E和F螺旋之间非螺旋区中的第七个残基。[依据A. E. Edmundson, *Nature* 205 (1965): 883; H. C. Watson, *Prog. Stereochem.* 4 (1969): 299-333.]

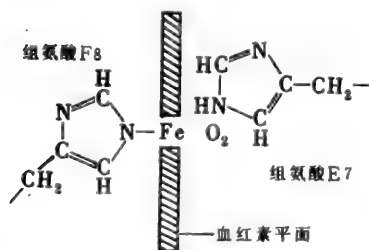
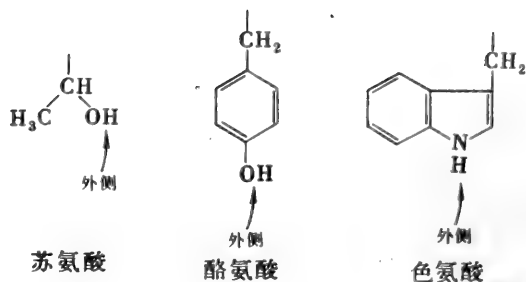


图3-14 肌红蛋白中氧结合部位的示意图：第五配位位置被组氨酸F8所占据(邻接组氨酸)；O<sub>2</sub>结合在第六配位位置上；而组氨酸E7(远侧组氨酸)靠近第六配位位置。



作用，从而会破坏 $\alpha$ 螺旋。

4. 肽基是共面的。碳基与主链的NH处在反位。而且键角和键长与在二肽和有关化合物中者很相仿。

5. 内侧和外侧很分明。内部差不多全由非极性残基，如亮氨酸，缬氨酸，甲硫氨酸和苯丙氨酸等组成。分子内部没有谷氨酸，天冬氨酸，谷酰胺，天冬酰胺，赖氨酸或精氨酸的侧链。对那些象苏氨酸，酪氨酸和色氨酸那样既有极性部分，又有非极性部分的残基来说，它们的取向务使非极性部分指向内部。在肌红蛋白内侧只有两个组氨酸是极性残基，而它们在活性部位起着关键作用。在分子的外侧，极性和非极性残基都有。

### 肌红蛋白中的氧结合部位

血红素基位于肌红蛋白分子的一个沟缝中。血红素极性很强的丙酸侧链都在分子的表面上。在生理pH下，这些羧酸将被电离。血红素的其余部分在分子的内侧，那里除了两个组氨酸外都被非极性残基所包围。血红素的铁原子直接与一个组氨酸，即残

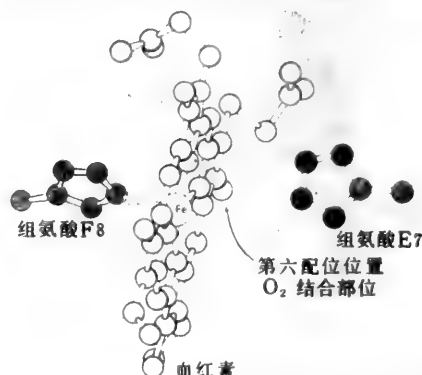
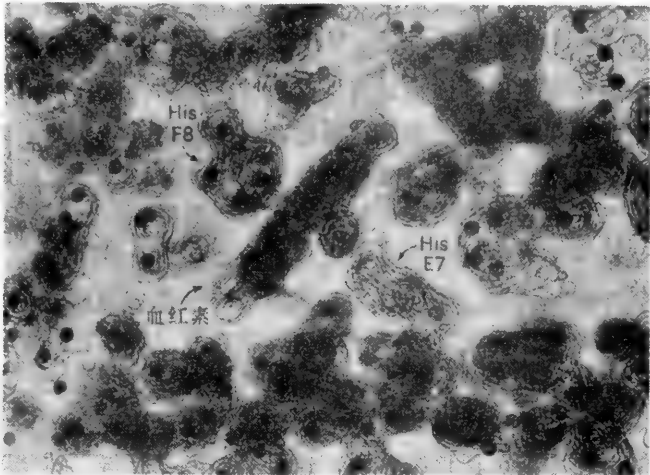


图3-15 肌红蛋白中氧结合部位的模型，示出血红素基，邻接组氨酸(F8)和远侧组氨酸(E7)。

基F8相结合(图3-14和3-15)。这个组氨酸,占据第五配位位置,称为邻接组氨酸。铁原子离开叶啉的平面约 $0.3\text{\AA}$ , 偏在组氨酸F8的一侧。氧结合部位在血红素平面的另一侧, 在第六配位位置上。第二个组氨酸残基(E7), 称为远侧组氨酸, 就在附近。这个远侧组氨酸E7并不与血红素组合。包含血红素的电子密度图截面示出于图3-16中。

肌红蛋白三种有生理意义的形式已被研究: 脱氧肌红蛋白, 氧合肌红蛋白和高铁肌红蛋白。除第六配位位置外, 它们构象很相似(表3-1)。在高铁肌红蛋白中, 这个部位被水占据; 在脱氧肌红蛋白中, 它是空位; 在氧合肌红蛋白中它被 $\text{O}_2$ 所占据。结合上去的 $\text{O}_2$ 的轴与铁-氧键成一角度 (图

图3-16 肌红蛋白的电子密度图在氧结合部位附近的切面。伸展在图下方的电子密度是E螺旋。[蒙Dr. John Kendrew 特许。]



3-17)。在氧合后铁原子向血红素平面移近约 $0.2\text{\AA}$ 。须要指出,血红素基不是一个刚性结构。当然, 氧合后铁原子的运动在血红蛋白的生理作用中是一个关键, 在下一章中将再讨论(本书57—58页)。

表3-1 血红素环境

形 式	铁的氧化状态	占 据 者	
		第五配位位置	第六配位位置
脱氧肌红蛋白	+ 2	His F8	空
氧合肌红蛋白	+ 2	His F8	$\text{O}_2$
高铁肌红蛋白	+ 3	His F8	$\text{H}_2\text{O}$

与血红素接触的一些残基都来自氨基酸顺序中不同的片段。有贡献的残基从C4到H14, 相当于顺序中的氨基酸39和138。因此, 血红素结合部位是一个道地的三维实体。

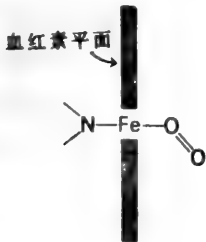


图3-17 在氧合肌红蛋白中 $\text{O}_2$ 的弯曲而用末端相接的取向。 $\text{O}_2$ 轴和 $\text{Fe}-\text{O}$ 键间的角为 $121^\circ$ 。

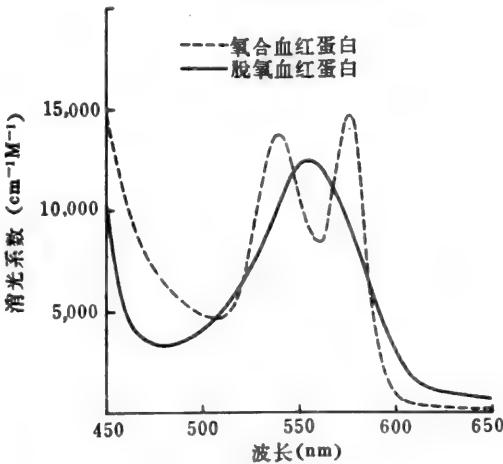


图3-18 肌红蛋白和血红蛋白的可见吸收光谱在结合氧以后明显改变。肌红蛋白和血红蛋白具有相似的可见吸收光谱。

## 血红素的受阻环境对可逆氧合作用是必要的

氧合部位在肌红蛋白分子中只占一小部分体积。诚然,氧只与血红素的铁原子直接结合。为什么肌红蛋白运载和贮存氧还需要多肽链呢?答案可以从考虑一个孤立的血红素基的氧合性质后得出。在水中一个孤立的亚铁血红素基能结合氧,但很短暂。原因在于亚铁血红素在水中很快氧化成高铁血红素,而后者不能结合氧。一种复合体,即将 $O_2$ 夹在两个血红素中间,是这个氧化反应的中间体。肌红蛋白的血红素氧化起来要困难得多,因为两个肌红蛋白分子不那么容易缔合以及生成血红素- $O_2$ -血红素复合体。生成这样的夹心物在空间上已受远侧组氨酸和其他包围第六配位部位的残基所堵塞。这个空间因素在决定血红素氧化速率中很重要,论证这一点最强有力的证据来自合成模型化合物的研究。科尔曼 (James Collman) 合成了围篱铁卟啉复合体 (图3-19), 它模仿肌红蛋白和血红蛋白的氧合部位。这些化合物在卟啉环的一侧有一个保护结合 $O_2$ 的围墙,而在另一侧没有阻碍,从而可以让一个碱结合上去。实际上,当这个碱为咪唑衍生物时,围篱化合物 (图3-20) 对氧的亲合力与肌红蛋白中相仿。此外,围篱稳住铁卟啉的亚铁形式,从而使它在较长的时期中能可逆地结合氧。这个模型化合物与普通的血红素之间的关键性差异在于前者有围篱,它阻止了夹心二聚体的形成。

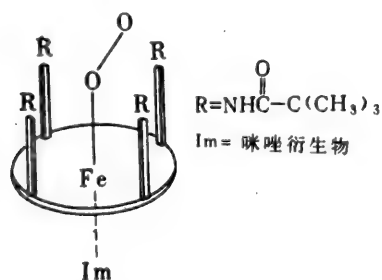


图3-19 结合了氧的围篱铁卟啉的示意图。围篱防止了两个这样的卟啉合在一起形成氧化中的主要中间体。

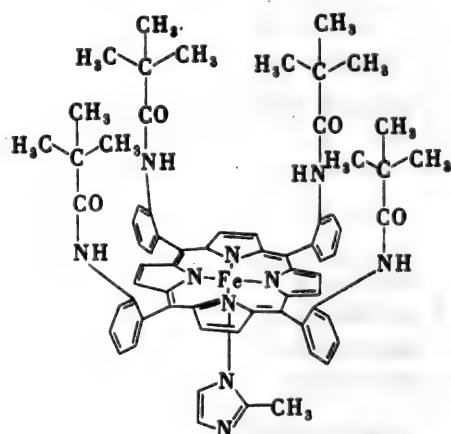


图3-20 围篱铁卟啉的结构式。[依据J. Collman, J. I. Brauman, E. Rose, and K. S. Suslick, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75 (1978): 1053.]

因此,肌红蛋白为它的辅基提供了一个特殊的微环境,而辅基赋予前者独特的性质。一般说来,辅基的功能部分地依赖于其多肽环境。例如,同一个血红素基在细胞色素c中具有很不相同的功能,而后者是存在于一切好氧生物线粒体中参与末端氧化链的一种蛋白质。在细胞色素c中,血红素是一个可逆的电子载体,而不是氧载体。血红素在过氧化氢酶中还有另外一种功能,后者催化过氧化氢转化为水和氧的反应。

## 远侧组氨酸的存在使一氧化碳的结合减少

一氧化碳是一个毒物,因为它与亚铁肌红蛋白和亚铁血红蛋白结合,从而干扰氧的运载。

血红素本身对CO有很高的亲和性。一个孤立的血红素在溶液中通常结合CO要比O<sub>2</sub>强25,000倍。但对肌红蛋白和血红蛋白来说,对CO的结合亲和力只比O<sub>2</sub>约大200倍。这些蛋白质是怎样抑制血红素对一氧化碳的内在偏爱的呢?答案来自x射线晶体学和红外光谱对CO和O<sub>2</sub>与肌红蛋白和模型铁卟啉形成的复合体的研究。在CO与铁卟啉形成的亲和力很强的复合体中,Fe, C和O原子排成笔直的一列(图3-21)。相反,在一氧化碳合肌红蛋白中,CO的轴是与

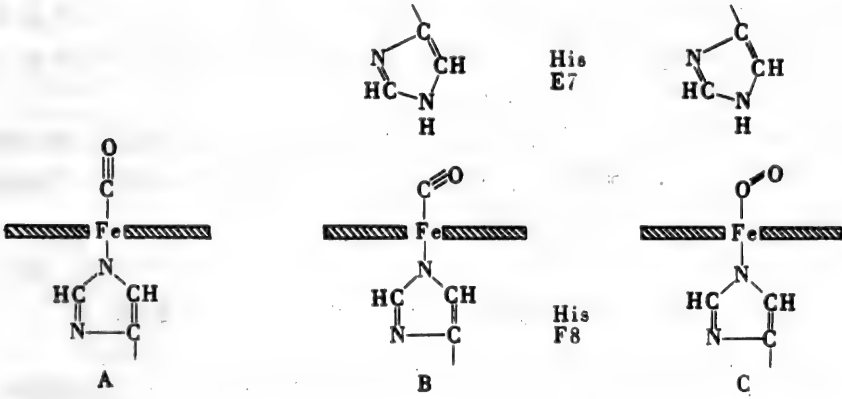


图3-21 肌红蛋白和血红蛋白对一氧化碳减低亲和力的结构基础: (A)CO与孤立铁卟啉结合的直线方式; (B)CO与肌红蛋白和血红蛋白结合的弯曲方式,后者中的远侧组氨酸(E 7)阻止CO直接结合,并使对CO的亲和力大为减弱; (C)O<sub>2</sub>在肌红蛋白和血红蛋白中结合的弯曲方式。孤立的铁卟啉也以弯曲方式结合氧。

Fe—C键成一角度。CO的直线结合主要受阻于远侧组氨酸产生的位阻。另一方面, O<sub>2</sub> 的轴,不论在氧合肌红蛋白和在模型化合物中都是与Fe—O键形成一个角度的。因此,蛋白质迫使CO成一角度地相结合而不是直线结合。这些球蛋白中的弯曲几何特性削弱了CO与血红素之间的相互作用,而使O<sub>2</sub>的结合最优化。

肌红蛋白和血红蛋白对CO亲和力的减低在生物学中是很重要的。在工业化社会出现之前很久,一氧化碳就已经是一个潜在的危险。它是在血红素分解时内生的(本书392页)。因此,CO在生物体中产生是与生物体应用血红素有着内在联系的。内生的一氧化碳的水平是这样的,肌红蛋白和血红蛋白中大约1%的部位被CO堵塞。这样的抑制程度当然是可以容忍的。相反,若这些蛋白对CO的相对亲和力接近孤立铁卟啉的特性值时,内生CO将导致大规模中毒。这个问题是在血红素蛋白质的演化中被解决的,它们终于能对O<sub>2</sub>和CO区别对待,主要通过位阻迫使CO以弯曲而较弱的方式结合上去。

### 肌红蛋白的结构在溶液中和晶态中很相似

肌红蛋白的高分辨率x射线分析为分子提供一个非常细致的图象,虽然是静态的图象。那末肌红蛋白的结构在晶态中究竟与在溶液中是否一样,这是个很中肯的问题。肌红蛋白的晶态不同于它在溶液中的状态之处,在于它的高离子强度, 3 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和不同肌红蛋白分子之间存在着相互作用。这些因素会不会使肌红蛋白的结构走样,以致从x射线分



析得出的图象对理解它的生物功能并不对口？肯定不是这样的。几个方面都有证据说明溶液和晶态中的结构是很相似的。

1. 肌红蛋白的晶态也是具有功能活性的。晶态肌红蛋白能结合氧。但反应不象在溶液中那么快速。晶态一般在反应性能上总要迟钝些。

2. 肌红蛋白血红素基的吸收光谱不论在溶液中或晶体中都是一样的。吸收光谱对血红素基的精细环境，是一种很灵敏的标志。

3. 一个分子在溶液中时的 $\alpha$ 螺旋含量可以从旋光色散和圆二色测量中估算出来。这样测出的肌红蛋白在溶液中的 $\alpha$ 螺旋含量与从晶体的电子密度图中引出的，相当符合。很难设想，构象上的重大变化会不伴随螺旋含量的改变。

4. 海豹肌红蛋白的x射线分析指出，这个分子的三级结构与抹香鲸肌红蛋白者很为相似。但这两种肌红蛋白的晶体点阵却很不相同，故而这两种晶体中肌红蛋白分子间的相互作用并不相似。因此，重大的畸变不大可能由晶体点阵引起。

### 非极性相互作用对稳定肌红蛋白的构象很重要

x射线分析揭示了肌红蛋白的结构，但并不直接说明为何肌红蛋白要折叠成那样。诚然，蛋白质化学中挑战性的课题之一是去发现那些氨基酸顺序如何决定三维结构的规则。从肌红蛋白结构中得出这样一个概括：分子内侧由紧密堆积的非极性残基组成。象缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和苯丙氨酸这样的残基是疏水的。假定给它们在水和非极性环境之间有所选择，它们明显地偏爱非极性环境。而且，这些紧密堆积的侧链之间还有范德瓦耳吸引力。因此，肌红蛋白折叠时的一个重要推动力是这些（疏水）残基避开水的倾向。这些疏水侧链聚集在分子内部要比伸到周围的水溶液中在热力学上更为稳定。折叠过程产生稳定性的原因在当外露疏水基周围的有序水分散后熵增加了（本书 98 页）。多肽链因此就在水溶液中自发地折叠，以致其疏水侧链被埋在内部，而其极性、荷电侧链露在表面。

### 松散的肌红蛋白能自发地重新折叠成活性的分子

血红素基对肌红蛋白的三维结构有何效应？为了回答这个问题，可以制备脱辅基肌红蛋白，它是脱去血红素基的肌红蛋白。将肌红蛋白溶液的pH降到3.5可以得到脱辅基肌红蛋白。在这个酸性pH下血红素基与蛋白质的结合力很弱，从而可以用有机溶剂提取后脱去。然后中和含有脱辅基肌红蛋白的水相。旋光色散测量指出，脱辅基肌红蛋白在中性pH下的 $\alpha$ 螺旋含量是60%，比起肌红蛋白的含量（75%）已明显下降。流体动力学研究指出，脱辅基肌红蛋白不如肌红蛋白紧密。此外，脱辅基肌红蛋白远不如肌红蛋白稳定。因此，血红素基的存在显然对肌红蛋白的结构产生了明显的效应。

折叠脱辅基肌红蛋白以及再插入血红素基是否为一自发过程？脱辅基肌红蛋白在中性pH下是在加入脲和胍后被解开的。 $\alpha$ 螺旋的含量在这样的条件下（8mol/L脲）几乎降到零。现在通过透析除去脲。 $\alpha$ 螺旋含量增加到60%，说明脱辅基肌红蛋白已重新折叠起来了。然后加入血红素到脱辅基肌红蛋白溶液中，就生成具有生物活性的分子（图3-22）。还原到亚铁状态并重新折叠的肌红蛋白充分恢复了可逆地结合氧的效能。因此，当脱辅基肌红蛋白与血



红素辅基结合后，肌红蛋白复杂的三维结构是脱辅基肌红蛋白的氨基酸顺序所固有的。这个结果加强了这样一个原理的普遍性：氨基酸顺序规定构象，而这个原理是在研究核糖核酸酶的复性时首先发现的。



图3-22 从松散的脱辅基肌红蛋白生成肌红蛋白。

## 血红蛋白由四个多肽链组成

现在我们转向血红蛋白，一个相关的蛋白。与单链的肌红蛋白不同，血红蛋白由四条多肽链形成。这四条链是由非共价相互作用裹在一起的。血红蛋白分子上有四个氧的结合部位，因为每条链含有一个血红素基。血红蛋白A，成人的主要血红蛋白，由两条一样的 $\alpha$ 链和两条属于另一种的 $\beta$ 链组成。这样，血红蛋白A的亚基结构为 $\alpha_2\beta_2$ 。成人还有一种量小的血红蛋白A<sub>2</sub>，它在全部血红蛋白中只占2%。血红蛋白A<sub>2</sub>的亚基结构为 $\alpha_2\delta_2$ 。幼儿有独特

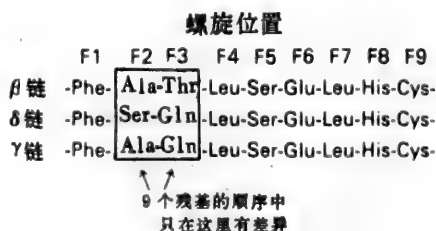


图3-23 人血红蛋白的 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 链具有相似的氨基酸顺序，这里示出残基F1至F9。

的血红蛋白。一种胚胎的 $\alpha_2\epsilon_2$ 血红蛋白曾在幼儿的生命早期检出。跟在它后面的是血红蛋白F，它的亚基结构为 $\alpha_2\gamma_2$ 。这些不同的血红蛋白的生物学意义是一个引人入胜的问题。这个问题将在下一章中考虑。这些血红蛋白中共同的 $\alpha$ 链含有141个氨基酸残基。 $\beta$ 、 $\delta$ 和 $\gamma$ 链具有相似的氨基酸顺序（图3-23），它们的长度都是146个残基。

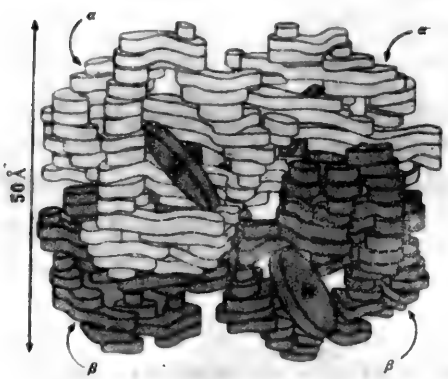
## 血红蛋白的x射线分析

前面提到，血红蛋白A的三维结构已被佩鲁茨（Max Perutz）及其同事测定。这个不朽的成就在1936年就已开始工作，当时佩鲁茨离开奥地利到英国剑桥去深造。佩鲁茨参加贝尔纳（John Bernal）的实验室，后者两年后为蛋白质晶体摄取了最早的几张x射线照相。贝尔纳和他当时的研究生霍奇金，D.（Dorothy Crowfoot Hodgkin）曾从胃蛋白酶取得极好的衍射

照相，从而指明蛋白质事实上也拥有确定的结构。他们在1934年就预见到 x 射线晶体学的远大前程“在于对蛋白质结构达成比原来的物理或化学方法所能给出的更为细致的结论。”虽然这样，这个预想是过了二十多年才实现的。当佩鲁茨选择血红蛋白作为他的论文题目时，人们已经解出的最大结构为染料酞花青，它含有58个原子。因此，佩鲁茨当时选择了一个大一百倍的分子来对付。难怪他说“我的同学都用一种带有怜惜的微笑来看我了。……幸亏我博士论文的审查人并未坚持我测出结构，否则我就需要再当23年研究生了”。幸好这时曾与他父亲在1912年首先应用 x 射线晶体学解出了结构的布拉格（Lawrence Bragg）当了卡文迪士（Cavendish）实验室的主任，并支持这个科研项目。后来布拉格曾写道：“我当时对前景的看法很坦率。认为这有点象把取得成功的几率为零乘以结构出来以后的重要性为无穷大；这个乘法的结局如何对任何人是一种猜测。”成功终于在1959年到来了，当时佩鲁茨获得了马氧合血红蛋白的一个低分辨率的电子密度象。从那以后，又取得了人和马的氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的高分辨率图。人和马的血红蛋白十分相似。

### 血红蛋白的四级结构

血红蛋白分子接近球形，其直径为55Å。四条链按四面体的排列堆积在一起（图3-24）。



血红素基位于分子外部的沟中，每个亚基中有一个血红素基。四个氧的结合部位隔得较远；两个邻近铁原子间的距离为25Å。每一个α链与两个β链都接触。相反，两个α链或两个β链之间就很少相互作用了。

图3-24 血红蛋白的低分辨率模型。这个模型中α链为浅色，β链为深色，而血红素基中标注H。[引自M.F. Perutz. The hemoglobin molecule, Copyright © 1964 by Scientific American, Inc.]

### 血红蛋白的α链和β链与肌红蛋白十分相似

肌红蛋白的三维结构与入血红蛋白的α和β链非常相似（图3-25）。它们的主链折叠得如此相似是出乎意料的，因为这三个多肽链的氨基酸顺序却有很多差异。事实上，对三种链来说，每条链中141个位置上的残基，只在24个位置上是相同的，这说明氨基酸顺序尽管很不相同，仍然可以规定很相似的三维结构（图3-26）。

显然，抹香鲸肌红蛋白以及人血红蛋白的α和β链具有广泛的生物学意义。事实上，这个结构似乎为脊椎动物的肌红蛋白和血红蛋白所共有。最早在肌红蛋白中得以确知的多肽链的复杂折叠方式，是大自然为一个氧载体所作的基本设计；它把血红素放在一个能使它可逆地载氧的环境中。

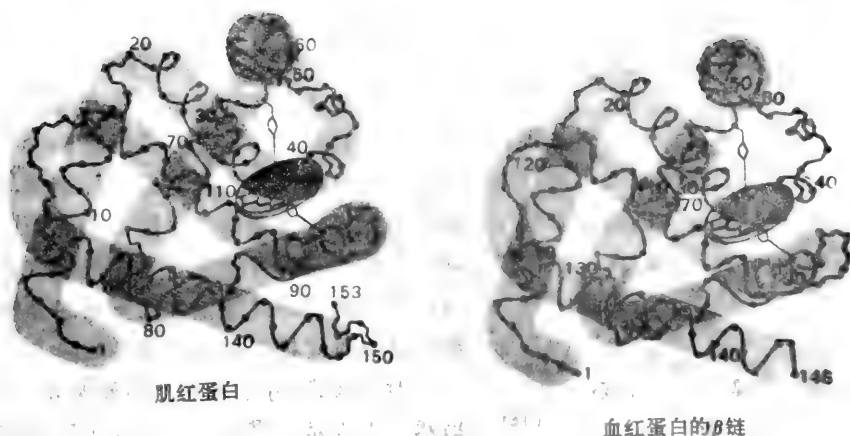


图3-25 肌红蛋白主链与血红蛋白β链的构象对比。构象之间的相似性很明显。[引自 M. F. Perutz. The hemoglobin molecule. Copyright © 1964 by Scientific American, Inc.]

		螺旋位置								
人血红蛋白		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
α 链		-Leu-Ser-Ala-			Leu	-Ser-Asp-Leu-			His	-Ala-
β 链		-Phe-Ala-Thr-			Leu	-Ser-Glu-Leu-			His	-Cys-
抹香鲸肌红蛋白		-Leu-Lys-Pro-			Leu	-Ala-Gln-Ser-			His	-Ala-

在 9 个残基的顺序中，  
只有三个完全一致。

图3-26 比较抹香鲸肌红蛋白以及人血红蛋白的α和β链的氨基酸顺序，从残基F1到F9。这三个多肽链的氨基酸顺序比起它们的三维结构来差异大得多。

## 氨基酸顺序中的关键性残基

已有二十多个物种（从八目鳗到人）的血红蛋白的氨基酸顺序为已知。比较这些顺序后指出大多数位置都有可观的变异。虽然这样，顺序中有九个位置在所有或几乎所有已被研究的物种中含有相同的氨基酸（表3-2）。这些保守的位置对血红蛋白分子的功能来说特别重要。

表3-2 血红蛋白中的保守氨基酸

位 置	氨基酸	作 用	位 置	氨基酸	作 用
F 8	组氨酸	与血红素相联的邻接组氨酸	C 2	脯氨酸	螺旋终结
E 7	组氨酸	血红素附近的远侧组氨酸	H C, 2	酪氨酸	形成氢键使H和F螺旋交联
CD 1	苯丙氨酸	与血红素接触	C 4	苏氨酸	未明
F 4	亮氨酸	与血红素接触	H 10	赖氨酸	未明
B 6	甘氨酸	允许螺旋B和E交接			

有些直接卷入氧结合部位。另一个保守残基是酪氨酸HC2，它在H和F螺旋之间形成氢键使分子趋于稳定。一个甘氨酸（B6）由于它很小而是保守的：一个比氢原子大的侧链就不会允许螺旋B和E象现在这样接近了（图3-27）。脯氨酸C2是要紧的，因为它使C螺旋终结。

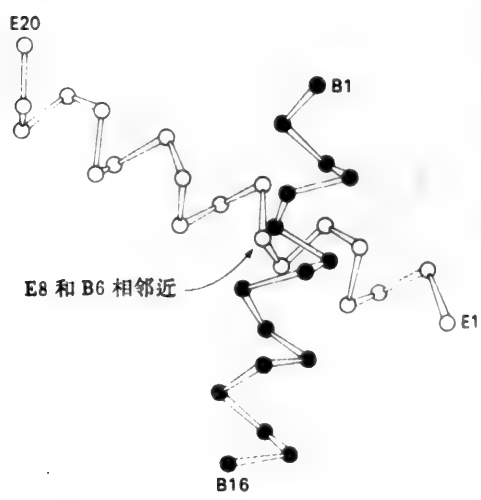


图3-27 肌红蛋白中B和E螺旋的交接。残基B6几乎总是甘氨酸，因为空间容不下一个较大的侧链。

在血红蛋白内部非极性残基的位置变化很可观。虽然这样，变化总不超出非极性残基的范围（如从丙氨酸换成异亮氨酸）。这样，分子内部惊人的非极性本色得以保留。象前面讨论过的那样，血红素基的可逆氧合要靠把它放在一个防水的非极性瓮中。此外，血红蛋白的非极性内核对稳定其三维结构来说也是要紧的。

对比起来，分子表面上的残基是十分可变的。当然，很少是一贯带正电荷或负电荷的。可以想到，脯氨酸由于它有中断螺旋的作用，应该是不变的。但事实并非如此。只有一个脯氨酸是不变的，而所有肌红蛋白中螺旋的长度和方向却很相似。显然，应该有其他终止或弯曲 $\alpha$ 螺旋的办法。

### 血红蛋白：进化中向前迈出的一步

到现在为止，强调了肌红蛋白和血红蛋白结构的相似性。但这两种分子在功能上是不大一样的。血红蛋白的亚基与肌红蛋白具有同样的结构设计。但合在一起形成一个 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体时，产生了具有深远生物学意义的新性能。这些将在下章中进行讨论。

### 概要

肌红蛋白和血红蛋白是脊椎动物中的载氧蛋白。肌红蛋白便于氧在肌肉中的运载，并并在其中贮存氧的作用。血红蛋白装在红细胞中，是血液中的氧载体。这些蛋白质能结合氧，因为它们含有一个结合得很紧的血红素辅基。血红素是一个取代的卟啉，在中央有一个铁原子。血红素中的铁原子可以处在亚铁(+2)或高铁(+3)状态中。只有亚铁形式才能结合 $O_2$ 。

肌红蛋白是一个单一的含有153个残基的多肽链(17.8kdal)，其外形紧凑。肌红蛋白内部几乎都是非极性残基，而外侧包含极性和非极性两种残基。多肽链中约有75%为 $\alpha$ 螺旋，共有八段螺旋。单一亚铁血红素基放在一个非极性的瓮中，它可以保护亚铁不致氧化为高铁形式。血红素的铁原子直接与组氨酸侧链的氮原子结合。这个邻接组氨酸(F8)占据第五配位位置。第六配位位置在血红素平面的另一侧，是 $O_2$ 的结合部位。第二个组氨酸，称为远侧组氨酸(E7)，很靠近这个位置。邻接组氨酸增加血红素对氧的亲合性。远侧组氨酸则借位阻限制一氧化碳的结合。第六配位位置附近的远侧组氨酸和其他残基也抑制了血红素被

氧化为高铁状态。

在功能上有活性的肌红蛋白能从松散的脱辅基肌红蛋白和血红素重新形成。复性实验指出,正如首先在核糖核酸酶上揭明的,肌红蛋白的构象是氨基酸顺序所固有的。非极性残基退居肌红蛋白内部,似为促进分子折叠的一个重要推动力。

血红蛋白由四条多肽链组成,每一条带一个血红素基。血红蛋白A是成人中主要的血红蛋白,具有亚基结构 $\alpha_2\beta_2$ 。血红蛋白A<sub>2</sub>是在成人中量很小的一种血红蛋白,具有亚基结构 $\alpha_2\delta_2$ ;而血红蛋白F是一种幼儿血红蛋白,为 $\alpha_2\gamma_2$ 。血红蛋白的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链的三维结构与肌红蛋白者惊人地相似,虽然它们的氨基酸顺序是很不相同的。对比来自许多物种的血红蛋白的氨基酸顺序后可以指出,有九个位置是几乎不变的。这一组被保守的氨基酸残基包括血红素附近象邻近和远侧组氨酸这样的若干个残基。每个亚基内部显著的非极性特性也是保守的。

## 习 题

1. 红血细胞的平均体积为87立方微米。红细胞中血红蛋白的平均浓度为34g/100ml。  
(a)一个红细胞中所含血红蛋白有多重?  
(b)一个红细胞中有多少个血红蛋白分子?  
(c)红细胞中血红蛋白浓度能否比观察值高得很多?(提示:假设红细胞含有一个血红蛋白分子组成的立方点阵,分子中心之间相隔65Å。)
2. 一个70kg的成人的血红蛋白中有多少铁?假设血的体积为70ml/kg体重,血中血红蛋白含量为16g/100ml。
3. 人的肌肉中肌红蛋白含量约为8g/kg肌肉。在抹香鲸中肌红蛋白含量约为80g/kg肌肉。问:  
(a)在人和抹香鲸肌肉中各有多少O<sub>2</sub>与肌红蛋白结合?假如肌红蛋白为O<sub>2</sub>所饱和。  
(b)溶入组织水中的氧(与37℃下的静脉血达成平衡)约为 $3.5 \times 10^{-5}$  mol/L。与肌红蛋白结合的氧对直接溶入抹香鲸肌肉的水中的氧达成什么比值?
4. 抹香鲸肌红蛋白的氨基酸组成为

Ala 5	Gln 5	Leu 18	Ser 6
Arg 4	Glu 14	Lys 19	Thr 5
Asn 2	Gly 11	Met 2	Trp 2
Asp 6	His 12	Phe 6	Tyr 3
Cys 0	Ile 9	Pro 4	Val 8

- (a)估算亚铁肌红蛋白在pH 2, 7和9时的净电荷。  
(b)估算肌红蛋白的等电点。等电点定义为不带净电荷时的pH。
5. 有一肌红蛋白溶液被用溴化氰处理。  
(a)有哪些裂解产物?查阅肌红蛋白的氨基酸顺序。  
(b)在水溶液中,裂解产物的 $\alpha$ 螺旋含量低。这个结果关于 $\alpha$ 螺旋在水溶液中的稳定性能说明什么?
6. O<sub>2</sub>与肌红蛋白结合可用简单的平衡式示出



令[Mb]代表脱氧肌红蛋白的浓度;[MbO<sub>2</sub>]为氧合肌红蛋白的浓度; $p\text{O}_2$ 为O<sub>2</sub>的浓度(以O<sub>2</sub>的分压示出);以及 $P_{50}$ 为[Mb]=[MbO<sub>2</sub>]时的 $p\text{O}_2$ 。引出与Henderson-Hasselbalch方程相仿的方程,将氧合肌红蛋白与脱氧肌红蛋白之比给成 $p\text{O}_2$ 和 $P_{50}$ 的函数。

7. 氧与肌红蛋白结合的平衡常数K为 $10^{-6}$  mol/L,在这里K定义为

$$K = [\text{Mb}] [\text{O}_2] / [\text{MbO}_2]$$

O<sub>2</sub>与肌红蛋白结合的速度常数为 $2 \times 10^7$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>。

(a) 从氧合肌红蛋白解离出 $O_2$ 的速度常数有多大?

(b) 氧合肌红蛋白复合体的平均持续时间是多少?

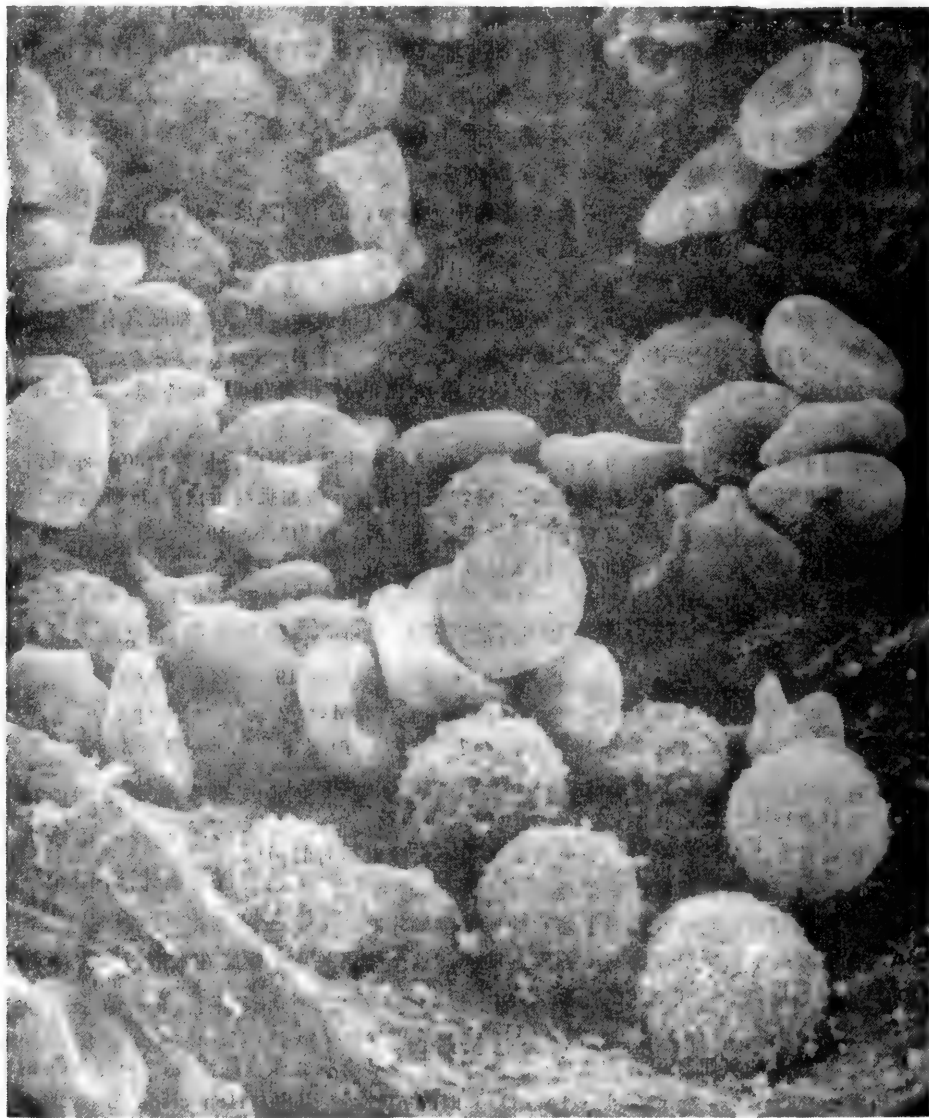
8. 溶液的吸光率 $A$ 定义为

$$A = \log_{10} (I_0 / I)$$

这里 $I_0$ 为入射光强度, 而 $I$ 为透射光强度。吸光率与摩尔吸收系数(消光系数) $\epsilon$  (以 $L\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ 表出), 浓度 $c$  (以 $\text{mol L}^{-1}$ 表出), 和光程长度 $l$  (以 $\text{cm}$ 示出)的关系如下:

$$A = \epsilon l c$$

肌红蛋白在580nm的消光系数为 $15,000\text{ L cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ 。在浓度为 $1\text{ mg/ml}$ 溶液中通过 $1\text{ cm}$ 光程的吸光率有多大? 有百分之几的入射光透过这个溶液?



扫描电子显微照片示出小血管中的红细胞(两边凹形)和白细胞(圆的)。[引自 *Tissues and Organs* by R. G. Kessel and R. H. Kardon, W. H. Freeman and Company, Copyright ©1979.]

## 第4章 血红蛋白：一种变构蛋白质

从单链的肌红蛋白进化为四条链的血红蛋白时出现了新的性能。血红蛋白是一种比肌红蛋白复杂得多的蛋白质。首先，血红蛋白除 $O_2$ 外，还能运载 $H^+$ 和 $CO_2$ 。其次，血红蛋白结合氧要受到它环境中的专一分子，即 $H^+$ 、 $CO_2$ 和有机磷化合物所调节。这些调节分子对血红蛋白结合氧的性能有很大影响，尽管它们在蛋白质上结合的部位远离血红素。的确，空间上分隔的部位之间的相互作用，所谓变构相互作用，发生于很多蛋白质中。变构效应对控制和整合生物体系中的分子事件起着关键作用。血红蛋白是了解得最清楚的一种变构蛋白，从而值得对它的结构和功能考查得仔细一些。



图4-1 血红蛋白的低分辨模型。在模型中 $\alpha$ 链是无色的， $\beta$ 链是深色的，而血红素基则用影线表示。[引自Perutz, The hemoglobin molecule, Copyright ©1964 by Scientific American, Inc.]

### 肌红蛋白和血红蛋白之间功能的差异

血红蛋白是一种变构蛋白质，而肌红蛋白不是。这种差异表现在三个方面：

1.  $O_2$ 与血红蛋白结合后促进更多的 $O_2$ 与同一血红蛋白分子结合。换言之， $O_2$ 与血红蛋白的结合是协作进行的。相反， $O_2$ 与肌红蛋白的结合并不协作进行。
2. 血红蛋白对氧的亲性和性有赖于pH，而肌红蛋白却与pH无关。 $CO_2$ 分子也对血红蛋白的氧合特性有影响。
3. 血红蛋白对氧的亲性和性还进一步受象二磷酸甘油酸这样的有机磷酸化合物所调节。结果是血红蛋白对氧的亲性和性低于肌红蛋白。

### 氧与血红蛋白的结合是协作的

饱和度 $Y$ 定义为氧合部位的占有率。 $Y$ 值可以从0（所有部位是空的）到1（所有部位被占据）。 $Y$ 对 $pO_2$ ，即氧的分压作图得出氧离解曲线。肌红蛋白和血红蛋白的氧离解曲线在两个方面有差异（图4-2和4-3）。对任何给定的 $pO_2$ ，肌红蛋白的 $Y$ 总比红血蛋白者高。换句话说，肌红蛋白对氧比血红蛋白对氧有较高的亲和性。亲和性可以用一个称为 $P_{50}$ 的量来

表征，它是要使50%的部位被占据（即 $Y = 0.5$ ）所需的氧分压。对肌红蛋白来说， $P_{50}$ 通常称为1 Torr\*，而血红蛋白的 $P_{50}$ 为26 Torr。

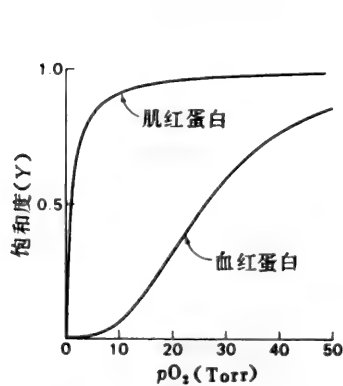


图 4-2 肌红蛋白和血红蛋白的氧离解曲线。  
氧结合部位的饱和度作为溶液周围氧分压的函数描出曲线。

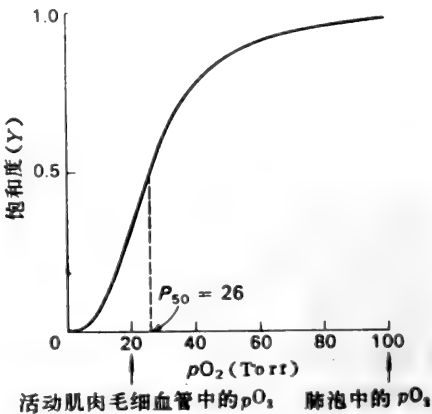


图 4-3 血红蛋白的氧离解曲线。活动肌肉的毛细血管中和肺泡中  $pO_2$  的典型值在  $x$  轴上标出。请注意，血红蛋白在生理条件下的  $P_{50}$  介于这两个数值之间。

第二点差异在于肌红蛋白的氧离解曲线是双曲线，而血红蛋白的是 **S** 形的。不久将论及，血红蛋白曲线的 **S** 形正好适合它在血液中承担的氧载体的生理作用。用分子的术语来说，**S** 形意味着血红蛋白结合氧的协作效应——这就是，在一个血红素上结合氧会促进其他血红素也结合氧。

我们要在定量的意义下考虑一下这些分子的氧离解曲线，并从肌红蛋白开始，因为它比较简单。肌红蛋白 (Mb) 结合氧的简单平衡为



氧合肌红蛋白离解的平衡常数  $K$  为

$$K = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \tag{2}$$

其中  $[MbO_2]$  为氧合肌红蛋白的浓度， $[Mb]$  是脱氧肌红蛋白的浓度，而  $[O_2]$  为未结合的氧的浓度，都以摩尔/升计。饱和度  $Y$  定义为

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} \tag{3}$$

将方程(2)代入(3)中得

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + K} \tag{4}$$

鉴于氧为一气体，用溶液周围大气中氧的分压  $pO_2$  (Torr) 来代表其浓度更为方便。方程(4)

\* Torr——  
一种压力单位，等于1mm汞柱在0℃和标准重力下所施加的压强(1mmHg)。此单位是按托里塞里，E. (Evangelista Torricelli) (1608—1647年) 命名的，他发明了汞气压计。  
编辑注：按我国国家标准规定，压力单位应为Pa，废除Torr。1 Torr = 133.322 Pa。因原文及图皆用托为单位，译文不易更改，暂作保留。



当成为

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \quad (5)$$

方程(5)描出一个双曲线。事实上,在方程(5)中若取 $P_{50}$ 为1 Torr,计算给出的氧解离曲线与肌红蛋白的实验观察曲线很接近。

相反,由于血红蛋白的曲线是S形的,方程(5)中给出的曲线都不合适。在分子方面,这意味着氧的结合是协作的。考虑一个极端的模型,其中只考虑脱氧血红蛋白(Hb)和结合四个分子 $O_2$ 的血红蛋白:



这个假想反应的平衡常数为

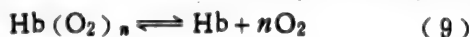
$$K = \frac{[Hb][O_2]^4}{[Hb(O_2)_4]} \quad (7)$$

并得出

$$Y = \frac{(pO_2)^4}{(pO_2)^4 + (P_{50})^4} \quad (8)$$

方程(8)描出一个S形曲线(图4-4)。但要注意,这个计算出来的曲线要比血红蛋白的实验曲线陡。换言之,方程(6)代表的模型是过于极端了。

那么,怎样表征一个结合过程才能具有适中的协作程度呢?1913年希尔, A. (Archbald Hill)指出,从血红蛋白结合氧的数据得出的曲线与从下列假想的平衡引出者颇为一致:



这个表达式给出

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n} \quad (10)$$

改写后给出

$$\frac{Y}{1-Y} = \left( \frac{pO_2}{P_{50}} \right)^n \quad (11)$$

这个方程指明,氧合血红蛋白( $Y$ )对脱氧血红蛋白( $1-Y$ )的比值,等于 $pO_2$ 对 $P_{50}$ 的比值的 $n$ 次幂。将方程式(11)的两边取对数后给出

$$\log \left( \frac{Y}{1-Y} \right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \quad (12)$$

请注意 $\log[Y/(1-Y)]$ 对 $\log pO_2$ 作出的图线给出一个斜率为 $n$ 的直线。这样的表示称为希尔(Hill)图,而在结合的中点( $Y=0.5$ )处的斜率 $n$ 称为希尔(Hill)系数。

肌红蛋白给出的曲线为 $n=1.0$ 的直线的希尔图,而血红蛋白(图4-5)的 $n=2.8$ 。肌红蛋白的斜率1.0意味着 $O_2$ 分子的结合是互相独立的,如方程(1)中所指。相反,血红蛋白的希尔系数2.8说明血红蛋白中氧的结合是协作的。一个血红素上的结合会促进四聚体中其他血红

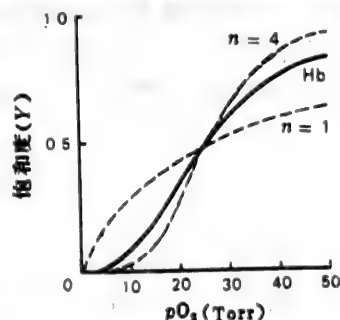
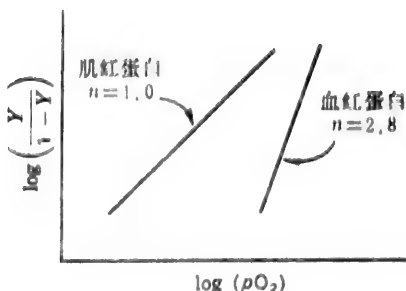


图4-4 血红蛋白的氧饱和曲线介于按 $n=1$ (非协作结合)和 $n=4$ (完全协作结合)计算出来的曲线之间。



素上氧的结合。反之，在一个血红素脱下氧也会促进其他血红素脱氧。换言之，血红蛋白分子中血红素基之间是沟通的。血红蛋白对氧的协作结合，有时称为**血红素—血红素相互作用**。这种相互作用的机理不久将予以论述。

图4-5 肌红蛋白和血红蛋白结合 $O_2$ 的希尔(Hill)图。血红蛋白的斜率2.8指出，它对氧的结合是协作的，与肌红蛋白不同，后者的斜率为1.0。

### 血红蛋白协作结合氧促进氧的运载

血红蛋白对氧的协作结合使它成为一个更为有效的氧运载体。血红蛋白的氧饱和度要比氧合部位互相独立时随 $O_2$ 的分压变化得迅速。我们可以考虑一个具体实例。假设肺泡中 $pO_2$ 为100 Torr，而在活动肌肉的毛细血管中为20 Torr。令 $P_{50} = 30$  Torr，并取 $n = 2.8$ 。这样， $Y$ 在肺泡毛细血管中为0.97，而 $Y$ 在肌肉毛细血管中为0.25。氧的传递正比于 $Y$ 值的差，即0.72。现在为一个假想的氧载体进行同一计算，它的 $P_{50}$ 仍为30 Torr，而其对氧的结合是非协作的( $n = 1$ )。那末，可以得出， $Y_{\text{肺泡}} = 0.77$ ， $Y_{\text{肌肉}} = 0.41$ ，从而 $\Delta Y = 0.36$ 。因此，血红蛋白对氧的协作结合比起氧合部位互相独立时传递氧的量增至两倍。

### $H^+$ 和 $CO_2$ 促进 $O_2$ 的脱去(波尔效应)

pH在很广的范围内以及 $CO_2$ 的变化都对肌红蛋白结合氧无影响。在血红蛋白中，酸度增加脱氧的倾向。在生理pH范围内，pH的下降使氧离解曲线往右移，从而减低对氧的亲合性(图4-6)。增加 $CO_2$ 的浓度(在不变的pH下)也会降低对氧的亲合性。在代谢迅速的组织，如收缩的肌肉中，会产生不少 $CO_2$ 和酸。在这样代谢活跃组织的毛细血管中 $CO_2$ 和 $H^+$ 的高水平的存在将促进 $O_2$ 从氧合血红蛋白中脱去。这个满足代谢活跃组织对氧高需求的重要机理是波尔(Christian Bohr)在1904年发现的。

10年后霍尔登(John B.S. Haldane)在肺泡毛细血管中发现了一个反方向的效应。那里的高浓度氧会使血红蛋白卸下 $H^+$ 和 $CO_2$ ，正如在活跃的组织中高浓度的 $H^+$ 和 $CO_2$ 把 $O_2$ 赶下来那样。血红蛋白对 $O_2$ ， $H^+$ 和 $CO_2$ 结合之间的联系称为波尔(Bohr)效应(图4-7)。

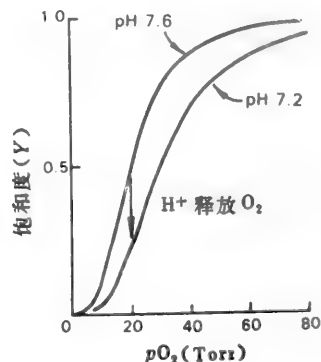


图4-6 pH对血红蛋白氧亲和性的效应。把pH从7.6降到7.2促使 $O_2$ 从氧合血红蛋白脱下。

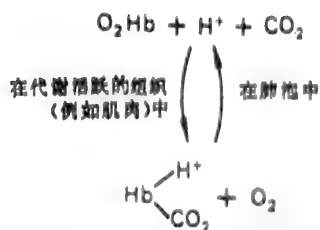


图4-7 波尔(Bohr)效应的归纳。实际的机理和化学计量要比图中示出的复杂得多。

## DPG降低氧亲和性

在红细胞内, 血红蛋白对氧的亲和性要比它在溶液中来低。早在1921年巴克罗夫特(Joseph Barcroft)就想过, “难道还有第三种物质存在……它形成氧-血红蛋白复合体的一个组成部分?”事实果然是这样。莱因霍尔德·贝尼希(Reinhold Benesch)和鲁思·贝尼希(Ruth Benesch)在1967年揭示, 2,3-二磷酸甘油酸(DPG)与血红蛋白结合, 并对后者的氧亲和性有很大影响。DPG在人的红细胞中大约与血红蛋白具有相同的摩尔浓度。无DPG时, 血红蛋白的 $P_{50}$ 为1 Torr, 与肌红蛋白的一样。若有它时,  $P_{50}$ 成为26 (图4-8)。这样, **DPG把血红蛋白对氧的亲和性减小到1/26**。DPG在生理上很重要。没有它, 血红蛋白在通过组织的毛细血管时将不能卸下氧, 因为那里的 $p\text{O}_2$ 约为26 Torr。

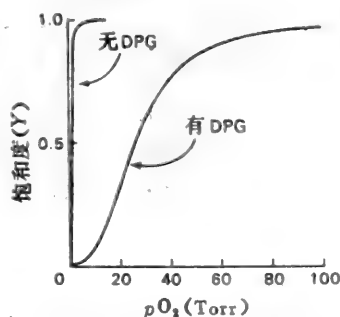
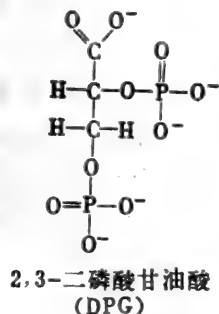


图4-8 二磷酸甘油酸减少血红蛋白对氧的亲和性。

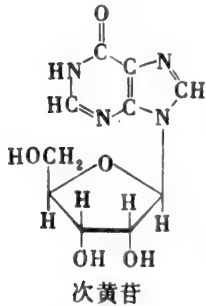
DPG对血红蛋白的氧亲和性是通过它与脱氧血红蛋白结合, 而并非通过与氧合血红蛋白结合而施以影响的。氧和DPG与血红蛋白的结合是互相排斥的。作为一个较好的近似, 血红蛋白在DPG存在时的氧合作用可以表示如方程式



## DPG的临床意义

发现DPG在运载氧中的作用曾在临床医学的若干领域中导致新的深入见解。例如, 一些时候以来已知血液贮存在酸-柠檬酸-右旋糖这样一个常用的介质中, 会增加对氧的亲和性:  $P_{50}$ 是16而不是26 Torr了。现在原因已经弄清楚了。在贮存期间对氧的亲和性增加, 因为同

时DPG的水平也在10天内从4.5mmol/L降到0.5mmol/L以下。贮存的血液对氧的亲性和在临床上具有重要意义。要是给病人大量氧亲和性较高的血液，在他组织中卸下的氧的数量



可以得到缓和。输入的红细胞，如已完全脱去DPG的话，可以在24小时重新取得正常水平的一半，但这样的恢复对重病人来说是来不及生效的。因此，在某些情况下，最好输入具有正常氧亲和性的红细胞。缺乏DPG的细胞的DPG水平并不能靠加入DPG来复原，因为红细胞的膜并不能让这个高度荷电的分子透过去。虽然这样，贮存红细胞DPG水平的下降是可以防止的，只要在悬浮它们的介质中含有次黄苷就行了。这个不荷电的核苷分子能透过红细胞膜。在红细胞中，次黄苷可以通过一个复杂系列的反应转化为DPG（见本书 255 页）。次黄苷现在常用来这样保持贮存血液功能的完整性。

对组织输氧障碍（称为缺氧）的机理也已为 DPG 的研究工作所阐明。我们可以考虑一个患阻碍性肺气肿的病人。这个病使细支气管中的气流受到堵塞。其结果是动脉血没有完全被氧饱和。诚然，这样的病人的动脉血的  $pO_2$  只有 50 Torr，这是正常值的一半。在他的氧离解曲线上有一个补偿性的转移，它起因于 DPG 水平从 4.5 增至 8.0 mmol/L。这个较高的 DPG 水平给出  $P_{50}$  为 31 Torr，而不是 26 Torr。当  $P_{50}$  为 31 Torr 时，动脉饱和度 ( $Y_A$ ) 为 0.82，而静脉饱和度 ( $Y_V$ ) 为 0.49，从而氧饱和度的变化 ( $\Delta Y$ ) 为 0.33。在正常的  $P_{50}$ ，即 26 Torr 下， $Y_A = 0.86$ ， $Y_V = 0.60$ ，从而  $\Delta Y = 0.26$ 。氧离解曲线的移动是对这个病人有利的，因为它使  $\Delta Y$  从 0.26 增至 0.33。因此，增高 DPG 水平导致运给组织的氧量增加 27%。

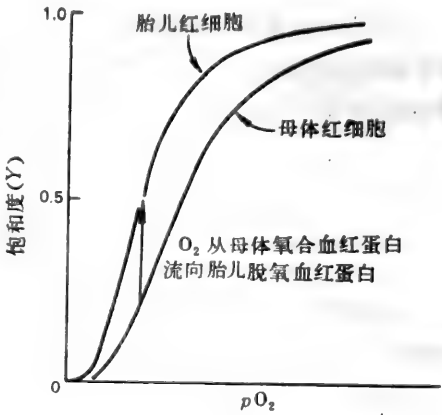
在红细胞的某些代谢障碍中，DPG 水平是反常的，而血红蛋白对氧的亲性和同时也有改变。这些障碍将在后面的章节中讨论（本书 214 页）。

高海拔适应的机理在呼吸生理学中是一个挑战性的课题。DPG 水平的改变会在这个适应过程中起着作用。若有人从海平面到 4500 米高处，红细胞中 DPG 的浓度当在两天内从 4.5 增至 7.0 mmol/L，而氧亲和性有一个相应的下降。动脉氧饱和度由于  $P_{50}$  增加而减小，但由于毛细血管循环中卸氧的程度高了，运载的氧增加了 ( $\Delta Y$  增大)。在回到海平面时，DPG 水平和  $P_{50}$  将向反方向改变。

### 胎儿血红蛋白对氧的亲性和高

胎儿有他自己的血红蛋白 F ( $\alpha_2\gamma_2$ )，前面已经提到，它不同于成人血红蛋白 A ( $\alpha_2\beta_2$ )。血红蛋白 F 的一个重要性质在于它在生理条件下对氧的亲性和比血红蛋白 A 来得高 (图 4-9)。血红蛋白 F 对氧的亲性和较高正好可以将氧从母体转移到胎儿的循环中。血红蛋白 F 依靠在胎盘循环另一侧的血红蛋白 A 的消耗得以氧合。

图 4-9 胎儿红细胞比母体的具有较高的氧亲和性。当 DPG 存在时，胎儿血红蛋白的氧亲和性要比母体的高。



胎儿血液具有较高的氧亲和性这一点已经知道好多年了,但最近才把它的基础有所阐明。血红蛋白F对DPG结合力不如血红蛋白A的强,从而对氧具有较高的亲和性。当然,没有DPG时,这两种血红蛋白对氧的亲合力大小关系就会颠倒过来了。这些观测结果曾经让人不能理解,直到弄清楚测定氧离解曲线时须有DPG,因为DPG在胎儿和成人红细胞中都存在。

变构效应起源于亚基之间的相互作用

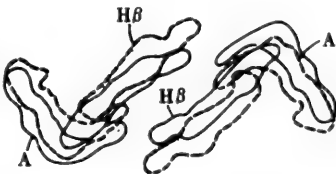
让我们考虑一下变构效应的结构基础。血红蛋白可以离解为组成的各个链。孤立的 $\alpha$ 链的性质是与肌红蛋白很相仿的。 $\alpha$ 链本身具有对氧的高亲和性,双曲线形的氧离解曲线以及对pH、CO<sub>2</sub>和DPG水平并不敏感的氧合特性。孤立的 $\beta$ 链很易形成一个四聚体, $\beta_4$ ,称为血红蛋白H。与 $\alpha$ 链和肌红蛋白一样, $\beta_4$ 完全没有血红蛋白的变构性能。简言之,血红蛋白的变构性能来自亚基间的相互作用。血红蛋白的功能性单位是一个由两种多肽链组成的四聚体。

氧合后血红蛋白的四级结构显著变化

1937年豪罗威茨, F. (Felix Haurowitz) 观察到,脱氧血红蛋白晶体在氧合时就被解体了。晶体之所以解体,原因在于氧合血红蛋白的结构与脱氧血红蛋白很不一样。氧合分子已经不能适应脱氧血红蛋白的晶体点阵了。相反,肌红蛋白晶体,象 $\beta_4$ 的晶体一样,并不受氧合的影响。

x射线晶体学研究指出,氧合和脱氧血红蛋白在四级结构上有明显差别(图4-10)。氧合

图4-10 氧合血红蛋白(实线)和脱氧血红蛋白(虚线)在分辨率为5.5 Å的电子密度图的部分投影。血红蛋白两条 $\beta$ 链的A和H螺旋在此示出。图的中心相当于分子中央的空隙。伴随氧合作用的构象变化之一,即H螺旋互相接近,也在此示出。[依据M. F. Perutz. *Nature* 228 (1970): 738.]



分子要来得紧密。例如,不同 $\beta$ 链的铁原子之间的距离在氧合作用中从39.9减为33.4 Å。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链之间接触情况的变化特别有意思。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链之间有两种接触区域,各称为 $\alpha_1\beta_1$ 和 $\alpha_2\beta_2$ 接触(图4-11)。在氧合血红蛋白转化为脱氧血红蛋白时, $\alpha_1\beta_1$ 接触很少变化。相反, $\alpha_1\beta_2$

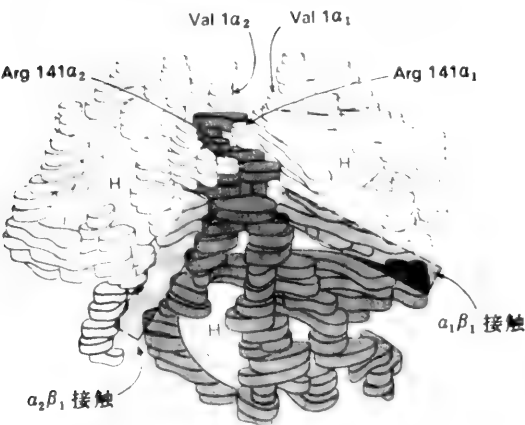
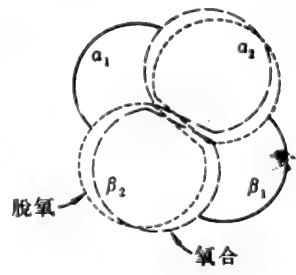


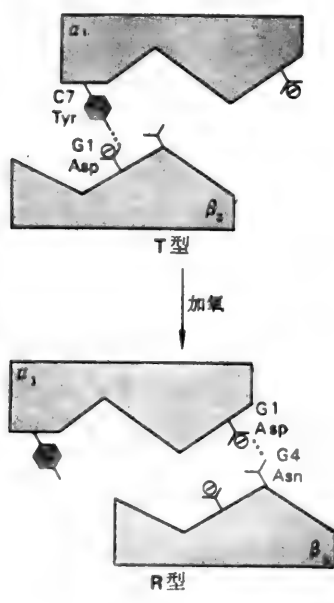
图4-11 氧合血红蛋白的低分辨模型, 示出 $\alpha$ 和 $\beta$ 链之间两种交接界面。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链分别为白色和灰色。在分子的这个侧面可以看到的三个血红素用H标出。 $\alpha_2\beta_1$ 和 $\alpha_1\beta_1$ 两个接触区各以长方条线框示出。[依据M. F. Perutz and L. F. TenEyck. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 36 (1971): 296.]

接触却有较大的结构变化。氧合中，一对 $\alpha\beta$ 亚基相对于另一对转动了 $15^\circ$ （图4-12）。在这

图4-12 氧合作用中四级结构变化的示意图。一对 $\alpha\beta$ 亚基相对于另一对转动了 $15^\circ$ 和平移 $0.8\text{ \AA}$ 。氧合分子中转动过的 $\alpha\beta$ 亚基以长虚线示出，而脱氧分子以短虚线示出。[依据J. Baldwin and C. Chothia. *J. Mol. Biol.* 129(1979): 192. Copyright by Academic Press Inc. (London) Ltd. ]



个交接界面上有些原子的移动量可以高达 $6\text{ \AA}$ 。事实上， $\alpha_1\beta_2$ 接触区被设计得象两个交替结构的开关那样。鸽尾形的 $\alpha_1\beta_2$ 交接界面的两种形式各被两组不同的氢键所稳定（图4-13）。



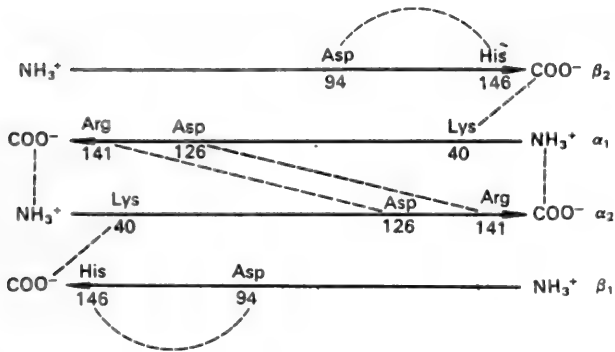
$\alpha_1\beta_2$ 接触是与血红素基密切相联的。因此，在这个区域中的结构变化当对血红素产生影响。 $\alpha_1\beta_2$ 接触的重要性，由于其中大多数残基并不随物种改变，变得更为突出了。此外，一切在 $\alpha_1\beta_2$ 接触中的突变都会减少血红素-血红素之间的相互作用，而 $\alpha_1\beta_1$ 接触中的突变并不这样。

图4-13  $\alpha_1\beta_2$ 交接界面在氧合作用中从T变换到R型。这个交接界面的鸽尾形构造允许两个亚基很易互相滑动。

### 脱氧血红蛋白受不同肽链之间的盐键所约束

在氧合血红蛋白中，所有四条链的羧基末端的几个残基都能完全自由转动。相反，在脱氧血红蛋白中这些末端基都被固定住了（图4-14）。首先， $\alpha_1$ 链的羧端与 $\alpha_2$ 链的氨端互相作用。其次，这个 $\alpha_1$ 链的羧端残基的精氨酸侧链与 $\alpha_2$ 链上一个天冬氨酸联在一起（以上两种交联同样表现在 $\alpha_2$ 链对 $\alpha_1$ 链上）。第三， $\beta_1(\beta_2)$ 链的羧端与 $\alpha_2(\alpha_1)$ 上一个赖氨酸侧链相联。最后， $\beta_1(\beta_2)$ 链羧端残基的咪唑侧链与同一链上一个天冬氨酸侧链相互作用。这些成对的残

基是被两个带相反电荷的基团之间的非共价的静电相互作用联接到一起的,后者常被称为盐键。脱氧血红蛋白比起氧合血红蛋白来是一个比较紧凑而受到更多约束的分子,就因为这八个盐键。



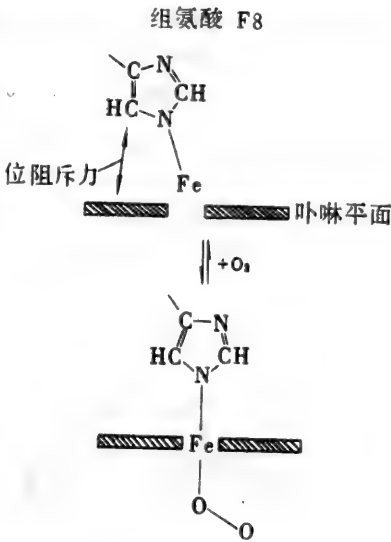
脱氧血红蛋白的四级结构称为T（紧张）型，而氧合血红蛋白属于R（松弛）型。称号R和T用来泛指各种变构蛋白的各种四级结构，T型对底物的亲和性较低。

图4-14 脱氧血红蛋白中不同亚基之间的交联。这些非共价性的静电相互作用在氧合作用中瓦解了。

### 铁原子在氧合作用中移入卟啉平面中

迄今讨论到的构象变化都是在离血红素有点距离的地方发生的。现在让我们看看氧合作用后在血红素基上发生了什么。在脱氧血红蛋白中，铁原子由于邻接组氨酸和卟啉的氮原子之间的位阻斥力，离开血红素平面约0.6Å（图4-15）。在氧合作用中，铁原子移进卟啉平面，这样就能与O<sub>2</sub>形成一个强键。形成这个键所取得的键能足以支付使邻接组氨酸靠近血红素平面所需的能。很多合成铁卟啉的结构研究指出，铁原子在五配位化合物中是偏离平面的，而在六配位络合物中落在平面中或几乎落在平面中。铁原子的电子自旋也会影响它的位置，高自旋有利于偏离平面。

图4-15 铁原子在氧合作用中进入血红素的平面。邻接组氨酸(F 8)与铁原子拉在一起，并且不象原来那样倾斜了。原先铁原子由于咪唑环的碳原子与血红素的氮原子之间的位阻斥力，偏离平面。

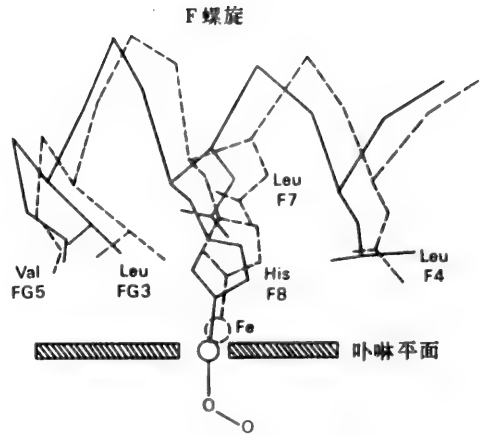


### 铁原子的运动通过邻接组氨酸传递到其它亚基

铁原子进入血红素平面的运动如何能有利于四级结构从T转化为R？在从一个亚基的血红素向一其它亚基的血红素传递结构变化时一个关键的侧链是邻接组氨酸，后者被铁原子拉着（图4-16）。血红素基与邻接组氨酸和十五个侧链都有接触，从而在氧合作用中F螺旋，EF转角和FG转角的结构都会改变。这些变化然后传递到亚基的交接界面。酪氨酸HC 2从F和H螺旋之间的口袋中排斥出来，导致链间盐键的折断。因此，两种四级结构之间的平衡在

氧合作用中向R型移动。这样，在亚基内部的结构变化（氧合作用）变成亚基之间交接界面上的结构变化。在一个血红素部位上结合氧的信息，从而可以传达到分子中隔得较远的部分。

图4-16 在氧合作用中铁原子移动引发的构象变化。邻接组氨酸被铁原子拉着，而且变得不像原来那么倾斜了。氧合结构以实线示出，而脱氧结构则为虚线。[依据J. Baldwin and C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 129(1979): 192. Copyright by Academic Press Inc. (London) Ltd.]



### 氧协作结合的机理

为什么血红蛋白对第四个  $O_2$  分子要比第一个结合力强了约300倍呢？图4-17定性地回答了这个问题。脱氧血红蛋白是一个紧凑的分子，它的四个亚基之间为八个盐键所约束。氧合作用要能发生，只有当这些盐键拆断一些，致使铁原子能移动到血红素基的平面中。为了结合一个  $O_2$  分子需要拆断的盐键的数目取决于它究竟是第一，第二，第三或第四个结合上去的  $O_2$  分子。让第一个  $O_2$  分子进去要比以后的每个分子拆断更多的盐键。拆断盐键需要能量，结合第一个  $O_2$  在能量上要比以后的氧分子更为不利。在这个图解中，第二和第三个  $O_2$  分子的结合亲和性介于第一和第四之间(图4-18)。氧亲和性的这种顺序上升，将给出S形氧合曲线，



图4-17 血红蛋白氧合作用邮票类比。撕下第一张邮票需要撕裂两条打孔的边。撕下第二和第三张只须撕裂一条边。第四张就不需要撕了。

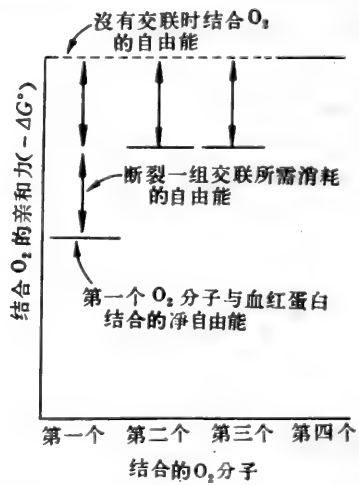


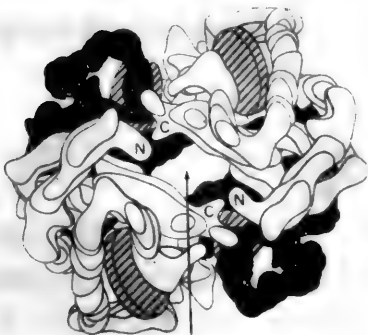
图4-18 根据图4-17中示出的模型，顺序结合  $O_2$  分子的自由能。结合亲和力 ( $-\Delta G^\circ$ ) 上增，因为结合第四个  $O_2$  分子比起结合第一个  $O_2$  分子需要拆断的交联少。



如实验观察到的那样。

这个变构机理还可以在结构上表达得更明确一些。几乎所有脱氧血红蛋白分子都在T型中。 $O_2$ 分子一个接一个地接合上去,使R型越来越多。这样,第一个 $O_2$ 分子与T型相结合,而第四个 $O_2$ 则与R型结合。T型比R型对 $O_2$ 的亲合力要小300倍,因为邻接组氨酸进入血红素平面的运动在T型中受到较大的约束。具体而言,邻接组氨酸在T型中要更为倾斜(见图4-16),从而在趋近血红素平面时位阻斥力较大。邻接组氨酸在R型中的位置比较对称,从而在趋近血红素平面时位阻较小。此外, $\beta$ 亚基中的氧合部位在T型中要比在R型中更受阻于缬氨酸E11。

### DPG通过交联脱氧血红蛋白降低氧的亲性和



DPG 结合部位

DPG以每个血红蛋白四聚体对一个DPG的比例专一地与脱氧血红蛋白结合。这是一个很有意义的化学计量。一个具有亚基结构 $\alpha_2\beta_2$ 的蛋白质通常对任何小分子至少有两个结合部位。每个四聚体中只能为DPG找出一个结合部位,就会立刻告诉我们DPG与血红蛋白结合在分子对称轴上的一个中央空穴中,那里四个亚基互相邻接(图4-19)。DPG结合部位是由两个 $\beta$ 链上荷正电的残基共同提供的: $\alpha$ -氨基、赖氨酸EF6和组氨酸H21。这些基团能与荷负电强的

图4-19 DPG的结合部位在脱氧血红蛋白的中央空穴中。[依据 M. F. Perutz, The hemoglobin molecule, Copyright © 1964 by Scientific American, Inc. ]

DPG相互作用,后者在生理pH下差不多带了四个负电荷。DPG在立体化学上正好与两条 $\beta$ 链中六个荷正电的基团形成的星座互补,它们都向着血红蛋白分子中的中央空穴(图4-20)。DPG与胎儿血红蛋白结合得不如与血红蛋白A强,因为在胎儿血红蛋白中残基H21不是组氨酸,而是丝氨酸。

在氧合作用中,DPG被挤出去了,因为中央空穴变得太小了。具体而言,两条 $\beta$ 链的H螺旋之间的空隙变窄了。此外, $\alpha$ -氨基间的距离也从16增至20Å,以致它们不再与DPG分子的磷酸根有什么接触了。

DPG降低氧亲和性这个效应的基

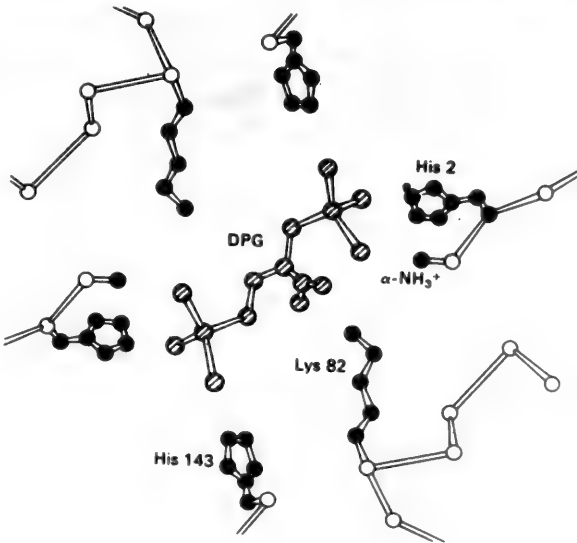


图4-20 DPG与人脱氧血红蛋白结合的方式。DPG与每条 $\beta$ 链上三个荷正电的基团相互作用。[依据 A. Arnone, Nature 237(1972): 148.]

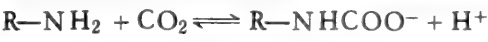
础现在变得很明显了。DPG通过它与两个 $\beta$ 链形成交联来使脱氧血红蛋白的四级结构趋于稳定。换言之，DPG使平衡移向T型。前面已经提及，脱氧血红蛋白有八个盐键，使它的羧端残基固定住。它们在氧合作用中必须拆断。DPG结合上去后提供了更多需要拆断的交联，从而血红蛋白的氧亲和性因DPG结合上去而被减小了。

### CO<sub>2</sub>与血红蛋白的末端氨基结合并降低其氧亲和性

在好氧代谢中，每消耗一个O<sub>2</sub>分子，约生成0.8个CO<sub>2</sub>分子。大多数CO<sub>2</sub>是作为碳酸氢根被运载的，后者在红细胞中通过碳酸酐酶的作用形成的：



这个反应中产生的H<sup>+</sup>有不少为脱氧血红蛋白用于波尔（Bohr）效应中。此外，CO<sub>2</sub>还被血红蛋白以氨基甲酸的形式运载。血红蛋白的 $\alpha$ -氨基未电离的形式能与CO<sub>2</sub>进行可逆反应：



结合的氨基甲酸形成盐键，后者稳定了T型。因此，CO<sub>2</sub>结合上去后会降低血红蛋白对氧的亲和性。反过来，CO<sub>2</sub>与脱氧血红蛋白要比氧合血红蛋白结合得紧。

### 波尔（Bohr）效应的机理

在从氧合转化为脱氧形式时血红蛋白是如何吸收质子的？有些部位对H<sup>+</sup>的亲亲和性上增是这个转化产生的后果。具体而言，有些基团的pK在从氧合到脱氧血红蛋白的转化中会被提高；pK的上增意味着H<sup>+</sup>结合得较强。血红蛋白每脱下一个O<sub>2</sub>分子，约吸收0.5个H<sup>+</sup>。这样来吸收H<sup>+</sup>有助于缓冲活性组织中的pH。

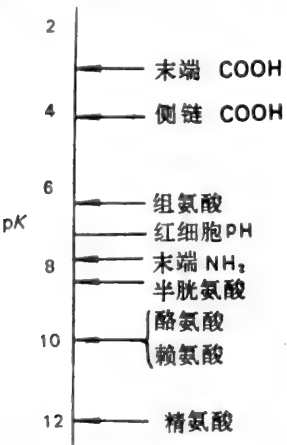



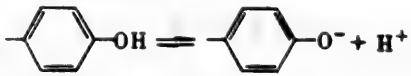
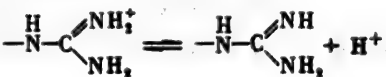
图4-21 蛋白质中酸性基团的典型pK值。一个基团的环境可以使它的实际pK偏离这里给出的值。

那末哪些基团的pK提高了呢？我们考虑一下血红蛋白对H<sup>+</sup>的可能结合部位（图4-21和表4-1）。然后来缩小选择范围。谷氨酸和天冬氨酸的侧链羧酸在正常情况下的pK约为4。很少可能，它们的pK值会增加到7和8之间，而一个基团要参与波尔效应就需要具有这样的pK值。同理，酪氨酸，赖氨酸和精氨酸侧链的pK值通常高于10，从而不大可能，它们的pK值能改变得那么多。因此，参与波尔效应的基团最有可能是组氨酸、半胱氨酸以及末端氨基，它们通常的pK在7上下。

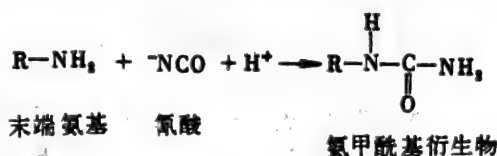
鉴定对波尔效应负责的那些具体的基团，是综合了化学和x射线研究中得出的信息后完成的。 $\beta$ 链的羧端组氨酸（组氨酸146 $\beta$ ）是在x射线研究的启发下推引出来的。这个建议曾在制备一个 $\beta$ 链上不带组氨酸146的血红蛋白中得到了检验。为此目的，曾应用羧肽酶B。这是一个专一的蛋白水解酶，能在有些多肽链中断裂肽键，后者含有羧端碱性氨基酸。这样修饰过的血红蛋白的波尔效应只有正常血红蛋白的一半。因此，每个 $\beta$ 链上的组氨酸146显得对波尔效应作出了主要的贡献。

血红蛋白的末端氨基在波尔效应中的作用，曾通过氰酸盐把它们修饰成氨甲酰基衍生物，

表 4-1 蛋白质中能电离基团的 pK 值

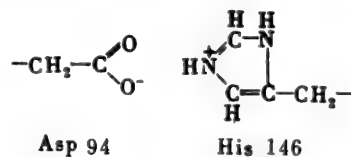
基 团	酸 $\rightleftharpoons$ 碱 + H <sup>+</sup>	典型 pK
末端羧基	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$	3.1
谷氨酸和天冬氨酸	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$	4.4
组氨酸		6.5
末端氨基	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	8.0
半胱氨酸	$-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^- + \text{H}^+$	8.5
酪氨酸		10.0
赖氨酸	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.0
精氨酸		12.0

而后者不再能与 H<sup>+</sup> 结合,从而得到确认。如果只有 β 链的末端氨基被氨甲酰基化,波尔效应不变。相反,要是 α 链的末端氨基被氨甲酰基化后,波尔效应就会减少很多。



x 射线得出的结果,为这些基团在波尔效应中发挥作用的方式,提供了一个具体的形象。在氧合血红蛋白中,组氨酸 146 β 可以自由转动,而在脱氧血红蛋白中,这个末端残基参与一系列相互作用。特别重要的是它的咪唑环与同一 β 链上荷负电的天冬氨酸 94 之间的相互作用。与这个荷负电的基团如此接近,咪唑基上结合一个质子的可能性大大增加了 (图 4-22)。换言之

图 4-22 天冬氨酸 94 在脱氧血红蛋白中,但不在氧合血红蛋白中提高了组氨酸 146 的 pK。在脱氧血红蛋白中,天冬氨酸 94 的负电荷的邻接有利于组氨酸 146 的质子化。



之,天冬氨酸 94 的邻近提高了组氨酸 146 的 pK。这样,在从氧合转化为脱氧血红蛋白时,组氨酸 146 对 H<sup>+</sup> 取得了较大的亲和性,因为它局部的荷电环境已有改变。

α 链的末端氨基的环境在脱氧作用后也有相似的变化。在氧合血红蛋白中,这些基团是自

由的。在脱氧血红蛋白中，一条 $\alpha$ 链的末端氨基与另一条 $\alpha$ 链的羧端基发生相互作用。在脱氧血红蛋白中，一个荷负电的羧酸残基的邻近可以增加这个末端氨基对 $H^+$ 的亲合性。x射线结果指明了波尔效应中的第三个基，即 $\alpha$ 链的组氨酸122。

综上所述，三对结合质子的基团（一个末端氨基和两个组氨酸）在氧合和脱氧血红蛋白中具有不同的环境。在脱氧血红蛋白中它们直接接触的环境荷负电更足。因此，一旦氧脱下后，这些基团就吸收 $H^+$ 了。

## 蛋白质分子的内部通讯

我们已经看到， $O_2$ 、 $H^+$ 、 $CO_2$ 和DPG的结合是互相联系着的。这些分子结合到位置不同的部位上，后者借构象变化在蛋白质内部互相通讯。结合部位是分开的，因为这些分子在结构上很不相同。不同部位之间的相互影响是以四级结构的变化为媒介的。实际上，每一个已知的变构蛋白质都由两个或更多的多肽链组成。两条链间的接触区域能放大和传递构象变化于两个亚基之间。一个变构蛋白质并无固定不变的性质。说得确切些，它的功能特性对它环境中的某些特定分子是敏感的。因此，变构相互作用在细胞功能中具有重大意义。在从肌红蛋白到血红蛋白的前进步伐中，一个能从环境感受信息的大分子出现了。

## 概 要

四聚的血红蛋白中出现了单链的肌红蛋白并不具备的新性质。血红蛋白除 $O_2$ 外，还能运载 $H^+$ 和 $CO_2$ 。此外，这些小分子的结合受变构相互作用所调节，后者定义为空间上相距较远的不同部位间的相互作用，它们在蛋白质中是通过构象变化来传递的。当然，血红蛋白是被了解得最清楚的变构蛋白质。血红蛋白表现出三种变构效应。第一，血红蛋白的氧结合曲线是S形的，这意味着氧的结合是协作型的。氧与一个血红素结合后，便利了氧与同一分子中其他血红素的结合。这样就可以运载更多的氧，因为它们是协作地结合上去的。其次， $H^+$ 和 $CO_2$ 促使 $O_2$ 从血红蛋白上脱下来，这个效应在生理上的重要性在于使氧在象肌肉这样代谢活跃的组织中释放得更多。反过来， $O_2$ 促使 $H^+$ 和 $CO_2$ 在肺泡毛细血管中脱下来。 $H^+$ 、 $CO_2$ 和 $O_2$ 的结合之间的这些变构联系称为波尔（Bohr）效应。第三，血红蛋白对氧的亲合性还受2,3-二磷酸甘油酸（DPG）调节，后者是一个负电荷密度较高的小分子。DPG可以与脱氧血红蛋白结合，但不能与氧合血红蛋白结合。因此，DPG降低血红蛋白对氧的亲合性。DPG在适应高海拔和缺氧方面起着作用。胎儿血红蛋白比成人血红蛋白对氧的亲合性较大，就因为它结合的DPG较少。

血红蛋白的变构性质来自它的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基之间的相互作用。T（紧张）型四级结构是受不同亚基之间的盐键约束的，后者使它对 $O_2$ 的亲合性较低。这些亚基间的盐键在R型中已被撤去，后者对 $O_2$ 具有较高亲合性。在氧合作用中，铁原子移入血红素的平面中，并把邻接组氨酸拉着一起移动。这个动作断裂了一些盐键，而平衡也就从T移向R。第四个 $O_2$ 分子结合得比第一个牢固得多，因为留下需要断裂的盐键已少得多了。DPG与两条 $\beta$ 链上荷正电的基团相结合，后者面向血红蛋白的中央空穴。DPG的结合使T型趋于稳定，从而对氧的亲合性有所减低。二氧化碳，另一个引起变构效应的分子，通过形成一个可逆的氨基甲酸键来与所

有四条链上的末端氨基结合。参预波尔效应的氢离子是与三对部位结合起来的。在脱氧血红蛋白中，一对末端氨基和两对组氨酸侧链都变得更荷负电了，这促使它们在脱下  $O_2$  时吸收  $H^+$ 。与 DPG 一样， $CO_2$  和  $H^+$  也是通过稳定 T 型而降低氧亲和性的。

## 习 题

- 下列处理对离体血红蛋白 A 的氧亲和性各有何作用？
  - pH 从 7.2 增至 7.4。
  - $pO_2$  从 10 增至 40 Torr。
  - $[DPG]$  从  $2 \times 10^{-4}$  增至  $8 \times 10^{-4}$  mol/L。
  - $\alpha_2\beta_2$  离解为单链亚基。
- 下列处理对结合到离体血红蛋白 A 的  $H^+$  数各有何作用？
  - $pO_2$  从 20 增至 100 Torr (在不变的 pH 和  $pCO_2$  下)。
  - 血红蛋白与过量氰酸的反应 (在不变的 pH 下)。
- 鸟和海龟的红血球含有一种不同于 DPG 的调节分子。这种物质也能为除去 DPG 后的人血红蛋白降低其氧亲和性。下列物质中哪一种你认为在这个方面最为有效？
  - 葡萄糖 6-磷酸
  - 肌醇六磷酸
  - $HPO_4^{2-}$
  - 丙二酸
  - 精氨酸
  - 乳酸
- 血红蛋白氧离解曲线的较好的近似经验方程
 
$$Y = (pO_2)^n / [(pO_2)^n + (P_{50})^n]$$
 式中  $n = 2.8$ 。这个方程的推引曾在本书 51 页论述。
  - 氧被运载的量与  $\Delta Y$ ，即饱和度的变化成正比。计算血红蛋白分子从肺到活动肌肉时的  $\Delta Y$ 。令  $P_{50} = 26$  Torr,  $P_{肺} = 100$  Torr 和  $P_{肌肉} = 20$  Torr。
  - 假设氧结合到血红蛋白上是非协作型的，但  $P_{50}$  仍为 26 Torr。对这样一个非协作型结合氧的分子， $\Delta Y$  有多大？
- 酸的  $pK$  部分地取决于环境。推测下列环境变化对谷氨酸侧链的  $pK$  所产生的作用。
  - 将一个赖氨酸侧链放在邻近。
  - 将蛋白质的末端羧基放在邻近。
  - 将谷氨酸侧链从蛋白质的外侧移至内侧的非极性部位。
- 在第五配位位置上带有各种碱的围篱铁卟啉的氧亲和性已被测定。若带 1-甲基咪唑时， $P_{50}$  为 0.49 Torr，而若带 1,2-二甲基咪唑时， $P_{50}$  为 38 Torr。为什么二甲基咪唑中多了一个甲基会使氧亲和性降低这么多？
- 连锁的概念对理解很多生化过程来说是很关键的。考虑一个蛋白分子 P，它能与 A 或 B 或两者结合：



这些平衡离解常数定义为：

$$K_A = [P][A] / [PA]$$

$$K_B = [P][B] / [PB]$$

$$K_{BA} = [PB][A] / [PAB]$$

$$K_{AB} = [PA][B] / [PAB]$$

- 设  $K_A = 5 \times 10^{-4}$  mol/L,  $K_B = 10^{-3}$  mol/L, 和  $K_{BA} = 10^{-5}$  mol/L。第四个离解常数  $K_{AB}$  的值是否已被确定？如已确定，这个常数有多大？

(b) A对B的结合有何作用? B对A的结合有何作用?

8. 一氧化碳与血红蛋白结合后形成CO-血红蛋白。CO-血红蛋白晶体是与氧合血红蛋白晶体同晶型的。血红蛋白中每个血红素能结合一个一氧化碳分子,但O<sub>2</sub>和CO不能同时与同一个血红素结合。对CO的结合亲和性约为对氧的200倍。在CO浓度为0.1%的空气中暴露1小时可以导致血红蛋白中一半的血红素部位为CO占据,而这往往是致命的。

霍尔登, J.S. (J.S. Haldane) 和普里斯特利, J.G. (J.G. Priestley) 在1935年提出 (和部分地解决了) 一个有趣的问题:

如果CO的作用只是减小血红蛋白的载氧能力,而并不在其他方面改变其性质的话,CO中毒的症状,如果考虑其他已知的事实,就很难理解了。这样,人的血液若被CO半饱和时就无法救活,正如我们看到的那样;但一个人的血红蛋白百分含量若因贫血而减少到一半时仍能照常工作。

这个似是而非的问题的关键是什么?

9. 蛋白分子P可逆地与一个小分子L相结合。平衡



的离解常数定义为

$$K = [P][L] / [PL]$$

蛋白将小分子从高浓度[ L<sub>A</sub> ] 区域运载至低浓度[ L<sub>B</sub> ] 的区域。假设未结合的小分子浓度不变。蛋白在区域 A和B之间来回走。

(a) 假定[ L<sub>A</sub> ] = 10<sup>-4</sup> mol/L 和 [ L<sub>B</sub> ] = 10<sup>-6</sup> mol/L。什么样的K值会给出最大的运载量? 为解答本题,

先写出公式表示ΔY, 即配位体结合部位的饱和度从区域A到B的变化, 然后取ΔY对K的导数。

(b) 对血红蛋白运载氧进行相似的处理。什么样的P<sub>50</sub>值会给出最大的ΔY? 假设P在肺中为100 Torr, 而P在组织的毛细血管中为20 Torr。对你算出的P<sub>50</sub>与生理值26 Torr进行对比。

## 第5章 分子病：镰刀形红细胞贫血症

在1904年，芝加哥的一个医生赫里克，J. (James Herrick) 检查一个20岁的黑人大学生，他因咳嗽和发烧送入医院。病人感到虚弱和头晕，并有头痛。他已经有一年感到心悸和气短。此外，他已有几年较少体力活动。三年前一只耳朵中曾出脓，持续了六个月。从小他小腿上经常长疮，而且不易愈合。

体检后发现病人体格发育较好，智力也好。他的眼白中略带黄色，粘膜苍白。他的淋巴结增大。小腿和大腿上约有20处伤疤。他的心脏异常得有点特别：心脏扩大并被查出杂音。赫里克记下：“心脏的作用让人想到是一个在强烈刺激下的心脏，但又得不出吸取任何刺激剂的历史。”

实验室化验包括仔细检查粪便，以便决定是否有寄生虫。对热带长大的病人来说，这样的可能性是很大的。但什么都没有找到。唾沫和痰中没有结核菌。尿中含有细胞残骸，指出肾脏有病，血液很不正常。

	观 测 值	正常范围
红细胞计数	$2.6 \times 10^6 / \text{ml}$	$4.6 - 6.2 \times 10^6 / \text{ml}$
血红蛋白含量	8 g 100ml	14—18g 100ml
白细胞计数	15,250 / ml	4,000—10,000 / ml

病人肯定是贫血，他的血红蛋白含量只及正常人的一半。红细胞的大小变化很大，还有很多小得异常的红细胞。此外，还看到很多成核的红细胞。它们是不含核的正常红细胞的前身。赫里克用这样一段话描述了异常的红细胞：“红细胞的形状很不规则，但特别引人注意的是大量细长、镰刀形和月芽形的红细胞。这些是在新鲜试样中看到的，不管用什么方法把血液铺在玻璃片上，都能看到，……在同一时间从其他人取出并按照相同条件制备的血样中就看不到它们了。它们肯定不是人为造成的，也不是任何形式的寄生虫。”

采用了由休息和营养食物组成的支持疗法。病人四周后出院，贫血已不象原来那么严重，感觉也好得多了。虽然这样，他的血液仍然表现出“红血球有一种变成异常的月芽形的倾向，虽然这已经不象原来那样显著了。”

赫里克颇为临床的情况和化验结果感到困惑。的确，他在发表病史之前等待了六年，然后坦率表明，“连一个明确的诊断都做不出来。”他注意到这是一种慢性病，表现出各种异常的体



图5-1 在光学显微镜中所见镰刀形细胞贫血病人血液中的镰刀形细胞。  
[蒙Dr. Frank Bunn特许]

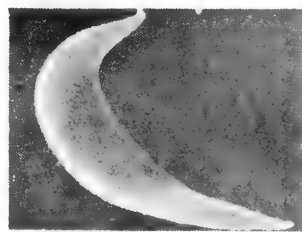


图5-2 镰刀形细胞贫血病人的一个红细胞的扫描电镜照片。  
[蒙Dr. Jerry Thornwaite and Dr. Robert Leif特许]

质和化验结果：心脏扩大、延及全身的淋巴结肿大、黄疸、贫血以及肾脏损伤的证据。他断言，这种疾病不能在任何器官的器质性损伤的基础上予以解释。他把不正常的血液状况挑选出来作为关键的发现，并为他的病例报告给出标题“一个严重贫血病例中所见细长和镰刀形的奇异红血球”。赫里克建议“红血球本身的组成中某些尚未认识的变化可能是决定性因素。”

### 镰刀形细胞贫血是一种遗传的慢性溶血性疾病

这种称为镰刀形细胞贫血病的其他病例，在赫里克的报告发表后接踵而至。的确，镰刀形细胞贫血不是一种稀有的疾病。只要有较多黑色人种居住的地方，这是一个重要的公共卫生问题。在一千黑人中约有四人要患镰刀形细胞贫血症。在过去，镰刀形细胞贫血通常是一种致命的疾病，往往在三十岁以前就死亡，这是由于感染、肾功能衰竭、心力衰竭，或形成血栓引起的。

镰刀形红血细胞会堵塞小血管。循环受到损害，伤及多种器官，特别是骨骼和肾脏。镰刀形细胞比正常细胞脆。它们易于溶血，从而比正常细胞寿命短。造成的贫血症一般很严重。慢性进程常因镰刀形细胞比例激增而不时出现危机。在这样的危机中，病人可以发生休克。

镰刀形细胞贫血是遗传性疾病。患镰刀形细胞贫血症的病人对一个位于常染色体上的不正常基因是纯合的。从父母一方接受一个不正常基因，而从另一方接受其正常等位基因的后代，当具有镰刀形细胞特性。这样的杂合子人通常并无症状。在杂合子的静脉循环中只有1%的红细胞是镰刀形的，对比起来，纯合子中约有50%。无论如何，镰刀形细胞特性，这种十个黑人中有一个具有的特性，不完全是好事。在高海拔进行剧烈的体力活动，坐在并非增压或密封舱内的空中旅行以及麻醉都可以对一个带有镰刀形细胞特性的人成为隐患。其原因不久将会明白。

### 脱氧镰刀形血红蛋白的溶解度低得反常

赫里克正确无误地猜测了造成镰刀形细胞贫血的缺陷所在。从这种病人取得的红细胞，若

氧的浓度降低后，会在显微镜载片上变成镰刀形。实际上，这些细胞中的血红蛋白本身就是有缺陷的。脱氧镰刀形细胞血红蛋白有一个低得反常的溶解度，约为正常脱氧血红蛋白者的二十五分之一。镰刀血红蛋白的浓溶液脱氧后会形成纤维状沉淀（图5-3）。这个沉淀使红细胞变形，成为镰刀形。镰刀形细胞血红蛋白通常称为血红蛋白S（Hb S），以有别于正常成人血红蛋白，即血红蛋白A（Hb A）。

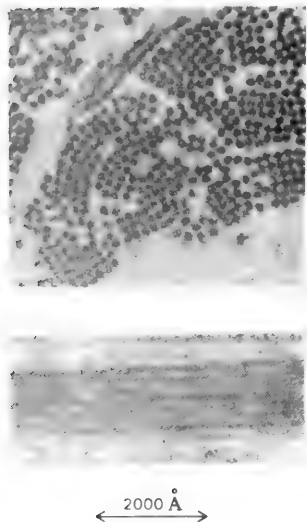


图5 3 脱氧镰刀形细胞血红蛋白纤维的电子显微图 上图示出截面，而下面的图为纵剖图。纤维粗 $170\text{Å}$ 。〔依据M. F. Perutz, J. F. Bertles, and J. T. Finch, J. Döbler, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (1973): 719.〕



血红蛋白S具有异常的电泳迁移率

1949年，鲍林（Pauling）及其合作者们检验了正常人以及镰刀形细胞特性或镰刀形细胞贫血患者血红蛋白的物理化学性质。他们的实验方法是通过观测这些血红蛋白在电场中的迁移率而研究其差别。这个方法称为电泳。蛋白质或任何其他分子在电场中的迁移速度（ $V$ ）取决于电场强度（ $E$ ），蛋白质上的净电荷（ $Z$ ）和摩擦阻力（ $f$ ）。摩擦阻力为蛋白质大小和形状的函数。迁移速度与这些变量的关系为

$$V = \frac{EZ}{f} \tag{1}$$

等电点为蛋白质上不带净电荷时的pH。在这个pH下，电泳迁移率为零，因为 $Z$ 在方程（1）中为零。低于等电pH时，分子荷正电；高于等电pH则荷负电。正常和镰刀形细胞血红蛋白的等电点见下表。这样，正常和镰刀形细胞血红蛋白之间的电泳差值在氧合和脱氧形式下都是一样的。

	正        常	镰刀形细胞贫血	差        值
氧合血红蛋白	6.87	7.09	0.22
脱氧血红蛋白	6.68	6.91	0.23

血红蛋白A和S的不同电泳速度可以来自净电荷 $Z$ 或摩擦系数 $f$ 的改变。单纯的摩擦效应（产生于形状改变）当在整个pH范围内使一个物种比另一个物种移动得慢。但情况并非如此。因为电泳速度对pH描出的图线（图5-4），为血红蛋白A和S给出相同的斜率。此外，其他物理化学实验，如速度沉降和自由扩散测量指出，两种氧合血红蛋白的摩擦系数是相同的。

这些观察建议，这两种血红蛋白中可电离基团的数目或种类有差异。每种血红蛋白中各有多少？曾从血红蛋白的酸-碱滴定曲线中作出了估计。在pH7附近，这个曲线几乎是直线。

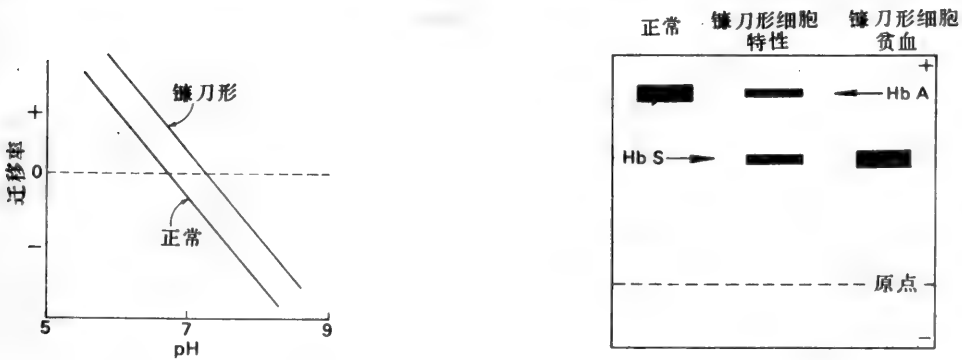


图5-4 镰刀形细胞血红蛋白和正常血红蛋白的电泳迁移率是pH的函数。

图5-5 从正常人，带有镰刀形细胞特性以及镰刀形细胞贫血患者分离出来的血红蛋白在pH8.6下的淀粉凝胶电泳图谱。

在血红蛋白溶液中 pH 每变化一个单位，产生约十三个电荷的改变。等电 pH 差 0.23，相当于每个血红蛋白分子约差三个电荷。得出的结论是，镰刀形细胞血红蛋白比起正常血红蛋白来，每个分子多了二到四个净正电荷。

那么这个差异是在多肽链，还是血红素基中？从镰刀形细胞血红蛋白分离出来的卟啉，根据它的熔点和 x 射线晶体学图式，是正常的。因此得出，两种血红蛋白之间的差异应在于它们的多肽链。

患镰刀形细胞贫血的病人（镰刀形基因的纯合子）带有血红蛋白 S，而无血红蛋白 A。相反，具有镰刀形细胞特性的人（镰刀形基因的杂合子）兼带两种血红蛋白，含量大致相等（图 5-5）。这样，鲍林的研究揭示了“一个明确的案例，关于单一基因中一个等位基因改变在蛋白分子中产生的变化”并涉及它的合成。这是第一次证实了一种分子病。

### 指纹法：检测镰刀形血红蛋白中改换了的氨基酸

电泳分析指出，血红蛋白 S 比血红蛋白 A 多了二到四个正电荷。这种差异可以有几种发生的方式。

Hb A	Hb S
中性氨基酸	带正电荷氨基酸
带负电荷氨基酸	带正电荷氨基酸
带负电荷氨基酸	中性氨基酸

精确地弄清楚这种变化而有所突破，是在 1954 年，当时英格拉姆 (Vernon Ingram) 设计了一个检测蛋白质中氨基酸置换的新方法。血红蛋白分子在分析中被断裂成较小的单位，因为

为不难预见，在包含 20 个残基的肽中检测变换了的氨基酸，显然要比在大了十倍的蛋白质中进行起来较为容易。胰蛋白酶用来专一地裂解血红蛋白在它的赖氨酸和精氨酸残基的羧基一侧。因为  $\alpha \beta$  半个血红蛋白中共含有 27 个赖氨酸和精氨酸残基，在胰蛋白酶消化作用中形成了 28 个不同的肽段。下一步就要分离这些肽段。这是通过一个二维方法（图 5-6）来完成的。将肽段混合物点在一大张滤纸角的一个点上。电泳先在一个方向进行，按照它们的净电荷来

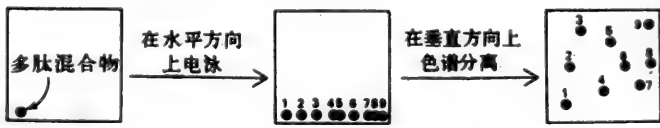


图 5-6 肽段混合物先通过电泳在水平方向分离；然后再通过分配色谱分析在垂直方向分离。

分离肽段。但电泳不足以完全分离肽段。有不少交迭。第二种分离技术，即纸色谱法，是与电泳方向垂直地进行的。在这个方法中，将最接近肽段的那一端滤纸浸在一个封闭玻璃缸内底部的有机溶剂和水的混合溶液中。溶剂沿滤纸上升。现在每个肽段有一个选择：它或者是与相当非极性的溶剂迁移，或者是粘着在极性很大的水合纤维素支持物上。这种分离技术称为分配色谱法。一个高度非极性的肽段会与上升的溶剂分配在一起，因此与溶剂前沿一起迁移到滤纸的顶部，而极性显著的肽段会留在滤纸的底部附近。纸色谱法和电泳是两种互

色谱法（层析法）——这个术语在 1906 年被茨韦特，M. (Mikhail Tswett) 引入，用来描述在碳酸钙柱上分离叶色素的情况，犹如光分解成光谱那样。字首和字尾各引自希腊字 chroma，色和 graphein，画或写

相补充的方法，因为它们是根据不同的特性来分离肽段的，即各依其极性程度和净电荷。这个多步骤的顺序——选择性裂解蛋白质为小肽，然后在二维中分离它们——称为指纹法。

所得的指纹是很能反映情况的。将指纹用茚三酮染色后肽斑成为明显可见。比较血红蛋白A和S的图（图5-7）后指出，除了一个肽段外其他都是一致的。那个不同的肽斑从指纹中洗脱下来，并经证实为八个氨基酸组成的单一肽段。氨基酸分析指出，这个肽段在血红蛋白S和A中只差一个氨基酸。

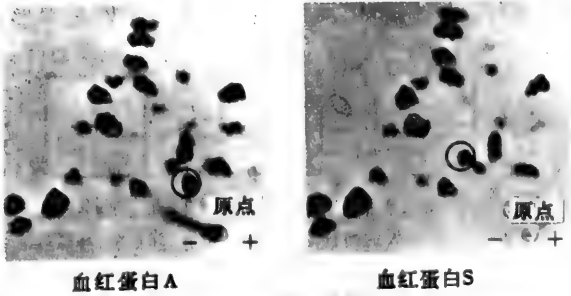


图5-7 茚三酮染色后的血红蛋白A和血红蛋白S的指纹对比。这两种血红蛋白中不同的那个肽段的位置用圆圈示出。〔蒙Dr. Corrado Baglioni提供。〕

β链中的一个氨基酸被改换

α和β链是用离子交换色谱法分离的。链分离后的指纹指出，血红蛋白S的变化在它的β链。实际上，差别位于β链的氨端胰蛋白酶解肽段。英格拉姆测定了这个肽段的顺序，并指出，血红蛋白S在β链的位6上已由缬氨酸置换了谷氨酸：

血红蛋白A	Val-His-Leu-Thr-Pro	<u>Glu</u> -Glu-Lys-
血红蛋白S	Val-His-Leu-Thr-Pro	<u>Val</u> -Glu-Lys-
	β1	2 3 4 5 6 7 8

镰刀形血红蛋白在它表面上有粘斑

缬氨酸具有典型的非极性侧链，而谷氨酸的极性很高。在β链的位6上用缬氨酸置换谷氨酸，就把一个非极性残基放到了血红蛋白S的外侧（图5-8）。这个改换显著减小脱氧血红蛋白S的溶解度，但对氧合血红蛋白S的溶解度很少影响。这个事实对理解镰刀形细胞贫血和镰刀形细胞特性的临床情况是很关键的。

镰刀形化的分子基础可以设想如下：

1. 用缬氨酸置换谷氨酸，给血红蛋白S每个β链的外侧一个粘斑（图5-9）。这个粘斑在氧合和脱氧血红蛋白S中都有，但血红蛋白A上没有。
2. 在脱氧血红蛋白S上有一个与粘斑互补的部位（图5-9）。它的位置还不知道。在一个脱氧血红蛋白S分子上的互补部位，与另一个脱氧血红蛋白S分子的粘斑相互作用，这就形成了细长的聚集体，并使红细胞变形。

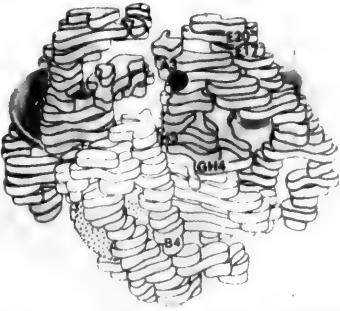


图5-8 脱氧血红蛋白A的低分辨模型。α链以无色示出，β链灰色。血红蛋白S中氨基酸改变的位置以大黑圆点标出。注意这个部位在分子的表面。  
〔依据 M. F. Perutz, J. F. Bertles, and J. Döbler, J. T. Finch, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (1973): 721.〕

3. 在氧合血红蛋白中互补部位已被覆盖。虽然仍有粘斑，但它不能与另一血红蛋白S结合，因为互补部位已不起作用。

4. 这样，镰刀形化发生于血红蛋白S的脱氧形式达到较高浓度之时（图5-10）。

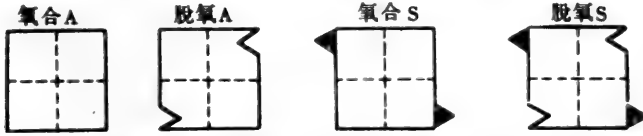


图5-9 黑三角代表氧合和脱氧血红蛋白S上都有粘斑，但在血红蛋白A的两种形式上都是不会有的。互补部位被一个能容纳三角的缺口所代表。这个互补部位既在脱氧血红蛋白S中存在，也很可能在脱氧血红蛋白A中存在

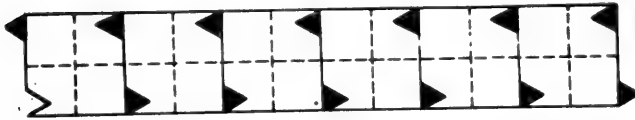


图5-10 脱氧血红蛋白S上的粘斑与另一个脱氧血红蛋白S上的互补部位相互作用形成细长聚集体。这里示出一股螺旋纤维。

这些事实说明了镰刀形细胞贫血的临床特性。当镰刀化发生在小血管中时，恶性循环就会开始。血管被堵塞后就会造成低氧浓度的局部区域。因此，更多血红蛋白会变成脱氧形式，从而发生更多的镰刀化。带有镰刀形细胞特性的人通常并无症状，因为它的血红蛋白中血红蛋白S不超过一半。这个浓度太低，在正常供氧水平上还不足以发生范围广泛的镰刀化。但若供氧水平特别低（如在海拔高时），也可在带有镰刀形细胞特性的人身上发生镰刀化。

### 脱氧血红蛋白S形成细长的螺旋纤维

已在前面描述，脱氧血红蛋白S形成使红细胞变形的纤维沉淀，并给予它们镰刀外形（图5-2）。电子显微镜下已看到两种纤维：一种纤维的直径为 $170\text{\AA}$ （图5-3）和更常见的一种直径为 $215\text{\AA}$ 的（图5-11）。常见的纤维沉淀是一个由外围十个、内部四个血红蛋白S构

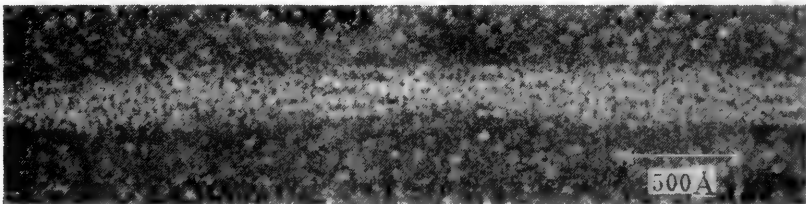
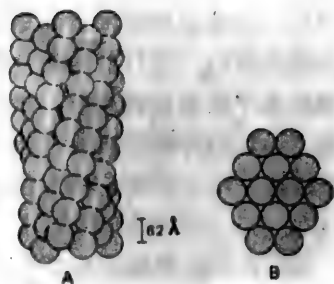


图5-11 脱氧血红蛋白S的一个负性染色纤维的电子显微图。[引自G. Dvkes, R. H. Crepeau, and S. J. Edelstein, *Nature*, 272 (1978): 509.]

成的十四股螺旋（图5-12）。这个十四股螺旋的重要特征在于每一个血红蛋白S分子至少与其他八个相接触。显然纤维由于多重相互作用而趋于稳定。那种有 $\beta$ 链的缬氨酸6参与的相

互作用使脱氧状态的热力学平衡转向形成纤维，但这也不是唯一的重要接触。

图5-12 脱氧血红蛋白S纤维的十四股螺旋模型：(A)轴向图；(B)截面图。  
每个圆代表血红蛋白S的四聚体。[依据G. Dykes, R. H. Crepeau, and S. J. Edelstein, *Nature* 272 (1978): 509.]



## 纤维形成速率与脱氧血红蛋白S的浓度密切相关

形成脱氧血红蛋白S纤维的动力学，对决定红细胞是否在通过约需一秒时间的毛细血管循环中变成镰刀形，是很重要的。最重要的决定因素是脱氧血红蛋白S，正如在离体研究中证实的那样。离体研究利用了脱氧血红蛋白S从高温到低温溶解度明显增加这一事实。脱氧血红蛋白S的聚合可以通过很快将溶液的温度从4°升到37℃来予以引发。纤维的生成可以通过监测物理性质的变化，如光散射的增加来予以测量。在脱氧血红蛋白S的浓度够低时，纤维的形成将被延迟好几分钟（图5-13）。事实上，延迟时间 $\tau$ 取决于脱氧血红蛋白S的浓度 $c$ （说得更精确一点，取决于热力学活度），按照公式

$$1/\tau = k (c / C_S)^n$$

式中 $C_S$ 是血红蛋白S在平衡时的溶解度， $k$ 为取决于环境条件的常数，而 $n$ 为这个聚合反应的幂相依性。令人注目的结果是， $n$ 是一个约为10的较大数。换言之，纤维形成的速率与脱氧血红蛋白S的活度的十次方成正比。因此，纤维生成

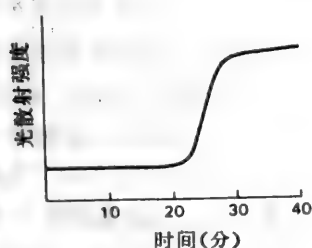


图5-13 离体脱氧血红蛋白S形成纤维的动力学，通过光散射变化来监测所得的结果。将温度从4°升到37℃来引发反应。较长的延迟相当于反应的成核阶段。



图5-14 脱氧血红蛋白S形成纤维过程中的成核阶段。这些核的集合要比以后的生长慢得多。[依据J. Hof-richter, P. D. Ross, and W. A. Eaton, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71 (1974): 4864.]

是一个高度协同的反应。动力学数据指出，成核是纤维形成中决定速率的阶段。只要约有十个脱氧血红蛋白S分子的临界分子簇一经形成，纤维就会很快生长（图5-14）。这样一个核可

能相当于十四股螺旋一圈的主要部分（图5-12）。这些结果在临床上具有重要意义。它们展示，热力学以及动力学的因素在镰刀化上都是很重要的。若纤维形成中的延迟时间长于从外围毛细血管到肺泡（进行重新氧合作用的地方）的通过时间，则已处于脱氧血红蛋白S 过饱和的红细胞也不致变成镰刀形。聚合速率对脱氧血红蛋白S 的强相依性说明了这样一个事实：带有镰刀形细胞特性的人通常是无症状的。这些杂合子红细胞中脱氧血红蛋白S 的浓度要比纯合子的低一半，从而它们形成纤维的速率大约要慢一千倍（ $2^{10} = 1024$ ）。

### 镰刀形基因的高发生率是由于抗疟的保护作用引起的

镰刀形基因的频率在非洲的某些地区可以高到40%。一直到最近，大多数纯合子都是夭折的，从而维持基因的高发生率当被强大的选择压力所驱使。尼尔（James Neel）倡议，杂合子能享受到不为正常纯合子和镰刀形细胞纯合子所分享的好处。实际上，艾利森（Anthony Allison）发现，带有镰刀形细胞特性的人对最为致命的疟疾具有抗性。在非洲疟疾的发生率和镰刀形基因的频率之间有确切的联系（图5-15）。这是一个明确的平衡多态现象——杂合子有抗疟性，但并无镰刀形细胞症状，而正常纯合子则易感染疟疾。

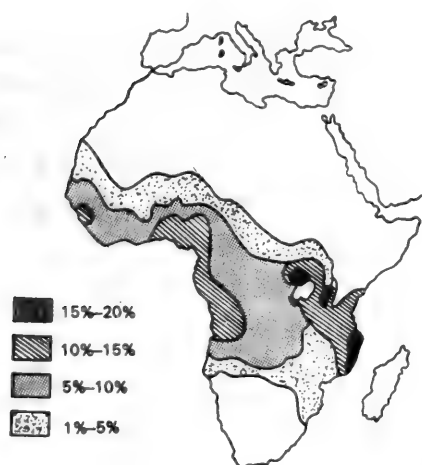


图5-15 在非洲镰刀形细胞基因的频率。高频率范围是主要死因为疟疾的区域。[依据 A. C. Allison, Sickle cells and evolution. Copyright © 1956 by Scientific American Inc.]

### 抗镰刀化药物的设计思想

现在正在应用对镰刀形细胞贫血分子基础的认识，设计专一而无毒的药物来防止或减少临床后果。正在按三种治疗策略探索。第一组有希望的药物，是抑制血红蛋白S 生成纤维的。用与 $\beta^S$ 链氨基末端区域和其他接触部位符合的顺序合成的寡肽，正在评选为立体专一的凝胶过程抑制剂。通过增加氧亲和性来减少血红蛋白S 在脱氧形式下浓度的化合物，是第二类抗镰刀化药剂。例如，氰酸进入红细胞并使血红蛋白的 $\alpha$ -氨基不可逆地氨基甲酰化来增加氧亲和性。血红蛋白与氰酸反应较快，因为 $\text{HN}=\text{C}=\text{O}$ （异氰酸），非电离型，是 $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ 的反应同类物。回顾前述，血红蛋白的末端氨基参与 $\text{CO}_2$ 的可逆结合（本书60页）。氰酸原来是一个很有希望的抗镰刀形药物，但后来广泛的临床试验发现它有毒性副作用。例如，有些病人用氰酸处理后发展出周围神经损伤，很可能因为血红蛋白以外的蛋白质也被氨基甲酰化。寻找毒性较小的血红蛋白修饰剂的工作正在进行。第三种治疗镰刀形细胞贫血的办法是减少红细胞中血红蛋白S 的总浓度。例如可以增加红细胞的体积来做到。即使红细胞体积增加不多，也会产生较大的抗镰刀化效应，因为形成纤维的速率是与脱氧血红蛋白S 浓度的高次方

成正比的。于是，红细胞膜中的离子泵和通道是治疗镰刀形细胞贫血中可以指望的目标。

### 血红蛋白的分子病理学

通过检查病人临床症状和利用电泳测试在正常人中进行普查，已经发现的异常血红蛋白在一百种以上。在北欧，三百人中有一人是血红蛋白A的一种变异体的杂合子。任何一个突变种等位基因的频率小于 $10^{-4}$ ，它比疟疾流行地区中镰刀形等位基因的频率要低几个数量级。换言之，大多数不正常血红蛋白并不使人得到选择优势。它们几乎总是中性或则有害的。

异常血红蛋白有几种类型：

1. 改换外部。几乎所有在血红蛋白分子表面上的置换都是无害的。血红蛋白S 是一个突出的例外。
2. 改换活性部位。缺陷亚基不能结合氧，因为血红素附近有一个结构变化，而血红素直接影响氧的结合。
3. 改换三级结构。氨基酸置换使多肽链不能折叠成它正常的构象。这些血红蛋白通常是不稳定的。
4. 改换四级结构。有些在亚基之间界面上的突变引起变构性质的丧失。这些血红蛋白通常具有异常的氧亲和性。

### 血红蛋白M：活性部位突变

将邻接或远侧血红素组氨酸置换为酪氨酸，使血红素稳定在高价铁状态中，后者就不再能结合氧了（图5-16）。酪氨酸侧链在这个与血红素的高价铁离子形成的络合物中是电离成离子的。这个变化不在 $\alpha$ 链，就在 $\beta$ 链中发生。的确，所有四个突变种都被观察到了。通过两个血红素的永久高价铁状态表征的突变种血红蛋白，称为血红蛋白M。字母M表示，改换的链是在高铁血红蛋白状态中。患者通常是发绀的。这疾病只在杂合子中出现，因为纯合性几乎总是致死的。

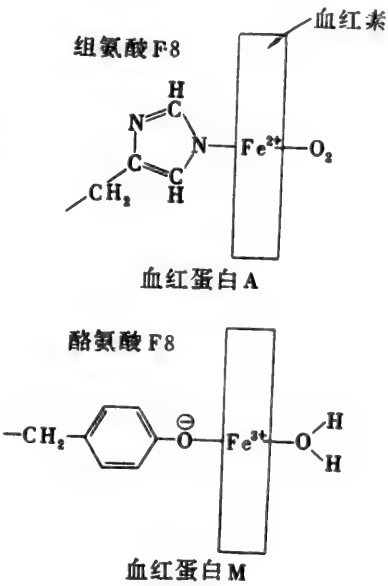


图5-16 酪氨酸取代邻接组氨酸 (F 8)后形成血红蛋白M。酪氨酸中荷负电的氧原子与高价铁原子配位。结合到第六配位位置上去的是水，而不是氧。

## 血红素口袋中极性基团阻碍血红素的结合

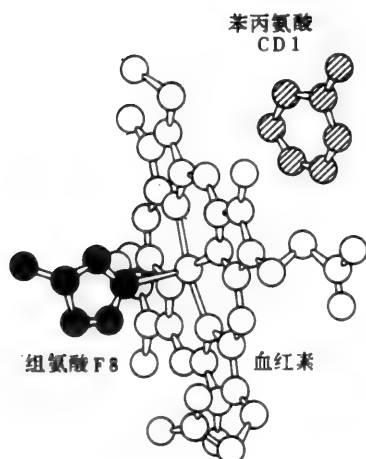


图5-17 苯丙氨酸CD1的位置，它是血红蛋白的一个保守残基。这个残基的苯环与血红素接触。

当一个在血红素的沟缝中的非极性基团被一个极性基团取代时，就发生另一种活性部位的突变。多肽链与血红素基之间有六十种原子间接触。这些接触的性质是非极性的。在很多物种的正常血红蛋白中这些相互作用的保守性足以说明，它们中的大多数对血红蛋白的功能来说是必需的。诚然，在这些血红素结合部位上的突变，几乎总导致有害的后果。例如，在血红蛋白Hammersmith中，在CD1的苯丙氨酸残基(图5-17)为丝氨酸所取代。这个变化阻碍血红素的结合，很可能因为极性的丝氨酸残基使水进入沟缝中，而在正常情况下那里是结合血红素的。

## 某些突变由于改变了三级结构而产生了不稳定的血红蛋白

在远离血红素的部位置换氨基酸可以阻止分子折叠成它的正常构象，从而严重地破坏它的功能。一个很受注意的实例为血红蛋白Riverdale-Bronx，它在B6用精氨酸取代了甘氨酸。精氨酸太大，B和E螺旋交接的狭小区域对它并不适合(图5-18)。事实上，在所有已知的正常肌红蛋白和血红蛋白中，B6总是甘氨酸。这个置换的效果是使血红蛋白Riverdale不稳定。

血红蛋白Gun Hill是已知突变影响了链中一个以上氨基酸残基的少数几个异常血红蛋白之一。在这个血红蛋白中，每条 $\beta$ 链的五个氨基酸都缺失。这些残基各相当于F螺旋的最后一个氨基酸以及F和G螺旋之间转角上的四个氨基酸。这种缺失突变去掉了一段与血红素基形成必要接触的多肽链。这样， $\beta$ 链中就没有血红素了。临床情况是溶血性贫血。

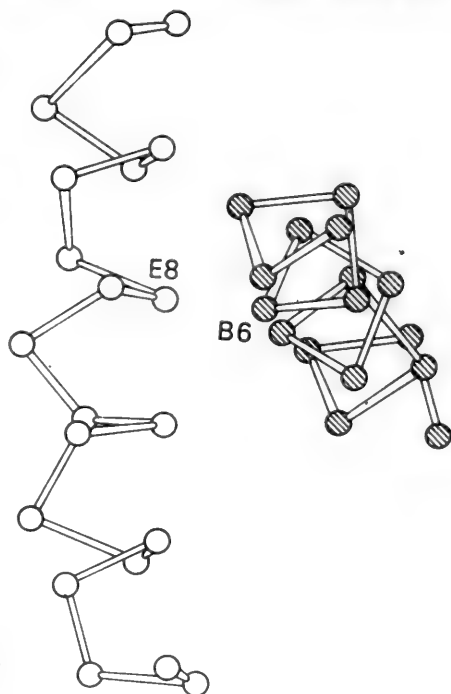


图5-18 血红蛋白分子只有当B6的残基为甘氨酸时才具有正常的结构。在B和E螺旋交接之处的空间，不足以容下一个较大的侧链。



## 变构相互作用在某些亚基界面突变种中受到了损害

有效地运载氧，要求血红蛋白的变构性质能充分发挥作用。血红素结合部位的完整性和血红蛋白亚基的正常折叠都是必要的，但对最佳功能来说还不够充分。亚基之间接触点上的残基也很重要，因为它们中有一些要在不同亚基之间传递信息。血红蛋白中相似链之间的接触是单薄的和极性的，而不相似链之间的接触是广泛的和以非极性为主的。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链之间的界面有两种不同的类型，即 $\alpha_1\beta_1$ 和 $\alpha_1\beta_2$ 。正如前面已经指出的那样， $\alpha_1\beta_2$ 接触似乎在传递变构相互作用中是个关键，因为在氧合以后这些界面上很有一些移动。这个论断进一步为以下发现得到证实：几乎所有在 $\alpha_1\beta_2$ 接触点上有所置换的血红蛋白都具有较弱的协作效应。此外，这些血红蛋白的氧亲和性通常是异常的。

例如，血红蛋白Kempsey的 $P_{50}$ 为15托，而正常值为26托。在这个突变种中， $\beta$ 链上的G1天冬氨酸已被天冬酰胺所取代。那么这个置换是怎样导致高得反常的氧亲和性的呢？回想一下脱氧血红蛋白中的 $\alpha_1\beta_2$ 界面是通过G1天冬氨酸与 $\alpha$ 链上的一个酪氨酸残基之间形成一个氢键而趋于稳定的（本书56页）。这个氢键对T（紧张）态的稳定性有贡献，而T态是表征正常脱氧血红蛋白的。血红蛋白Kempsey中缺乏这种相互作用会减少它的T态的稳定性，从而产生了较高的氧亲和性。反过来，损害R（松弛）态稳定性的突变就必然会减小氧亲和性了。事实上，血红蛋白Kansas的 $P_{50}$ 是70托。带有这种血红蛋白的患者明显发绀，因为他们动脉氧饱和度约只有0.6，而不是0.97。在血红蛋白Kansas中，G4天冬酰胺已被苏氨酸所置换，使这个残基不能形成一个在正常血红蛋白中能稳定氧合血红蛋白的氢键了。

## 发现突变种血红蛋白所造成的影响

影响氧运载的突变对分子生物学、医学、遗传学和人类学都产生了重大影响。它们的重要性有三个方面的：

1. 它们是对正常血红蛋白的结构和功能之间产生透辟见解的源泉。一个单一氨基酸残基的突变是自然提供的高度专一的化学变种。它们指明，分子的哪些部位对功能是关键性的。

2. 突变种血红蛋白的发现，揭示出在一种多肽链上一个单一氨基酸的改变就足以产生疾病。分子疾病的概念，现在已成为医学中的一个组成部分，起源于对镰刀形血红蛋白的深入研究。

3. 突变种血红蛋白的发现已增进我们对进化过程的理解。突变是进化的原料：镰刀形细胞贫血的研究已指明，一个突变同时既可以有益，也可以有害。个体的疾病可以伴随进化过程而来的，正如朱克坎德尔（Zuckerkandl）和鲍林（Pauling）（1962）形象地描述过的那样：

从主观来说，进化最经常地显得是从一种疾病得到痛苦。而这些疾病当然是在分子水平上发生的。

从能不能进入天堂来解释的善和恶的观念，看起来很象是本身变成进化的一种分子疾病。

## 概 要

一种蛋白质在基因突变中引起了一个单一氨基酸的改变，都能产生疾病。了解最清楚的

通过对血液病患者血红蛋白的检查以及在正常人中的普查，已经发现了一百种以上的突变种血红蛋白。电泳迁移率与血红蛋白A不同的血红蛋白被进行了指纹化，并测定了指纹中新肽的氨基酸顺序。已知若干类型的突变种血红蛋白。首先，几乎所有在血红蛋白分子表面上的置换都是无害的。血红蛋白S是一个突出的例外。其次，氧合部位常由于血红素附近的置换受到损害。例如，酪氨酸置换邻接或远侧的组氨酸后形成了血红蛋白M，而后者被锁在高铁状态中，从而无法进行氧合。第三，在分子内部进行改换常使三级结构产生畸变，并成为一个个不稳定的分子，如在血红蛋白中原来正好容得下的小的甘氨酸被精氨酸取代就会产生这种情况。第四，在亚基界面进行的改换常使变构性质丧失。氨基酸的置换会优先稳定T或R态，从而来改变氧亲和性。

1. 一个电泳迁移率异常的血红蛋白在一个筛选程序中被检测到。胰蛋白酶消化后进行的指纹化揭示, 氨基酸置换发生在 $\beta$ 链上。正常的氨基末端胰蛋白酶肽段(Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys)不见了。找到了一个新的胰蛋白酶肽段, 由六个氨基酸残基组成。缬氨酸是这个肽的氨基末端残基。

(a) 哪些氨基酸置换与这些数据一致?

(b) 这个血红蛋白的电泳迁移率在pH 8下与HbA和HbS对比会有何情况?

2. 一系列突变种HbA分子在pH 8.6下的电泳迁移率示出如下:

Hb D ( $\alpha$ 68)	赖氨酸取代天冬酰胺
Hb J ( $\beta$ 69)	天冬氨酸取代甘氨酸
Hb N ( $\beta$ 95)	谷氨酸取代赖氨酸
Hb C ( $\beta$ 6)	赖氨酸取代谷氨酸

不存在。但后来发现，这种杂交血红蛋白事实上留在溶液中。为什么它不在凝胶图谱中出现？

[提示：考虑电场对平衡  $2(\alpha_2\beta\beta^S) \rightleftharpoons \alpha_2\beta_2 + \alpha_2\beta_2^S$  的影响。]

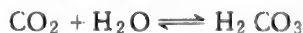
5. Hb A抑制Hb S形成细长纤维，以及红细胞在脱氧后的镰刀化。为什么Hb A具有这个效应？
6. 在高离子强度下，血红蛋白在 $\alpha_1\beta_2$ 界面处断裂为 $\alpha\beta$ 二聚体。在与血红蛋白A的对比下，推测血红蛋白Kempsey的氧合和脱氧型的离解性。

## 第6章 酶的引论

生物体系中的化学反应很少是在没有催化剂的情况下进行的。这些催化剂是称为酶的专一蛋白质。酶的突出特征是它们的催化能力和专一性。还有，很多酶的活性是被调节的。此外，有些酶与不同能量形式的转化，密切相关。我们要来考察一下酶的这些非常独特和在生物学中极为关键的性质。

### 酶具有巨大的催化能力

酶加速反应至少一百万倍。诚然，生物体系中的大多数反应，在没有酶的情况下，是不能以可觉察的速度进行的。即使象二氧化碳水合这样的简单反应也是通过一个酶来催化的。



否则， $\text{CO}_2$  从组织到血液，然后到肺泡气的转移将不能安全。碳酸酐酶，催化这个反应的酶，是已知最快的酶中的一个。每个酶分子能在一秒钟内水合  $10^5$  个  $\text{CO}_2$  分子。这个经过催化的反应，要比未经催化的反应快  $10^7$  倍。

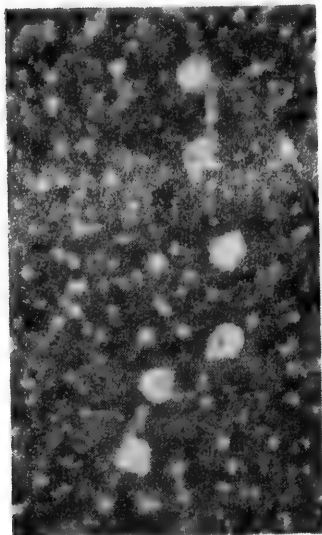
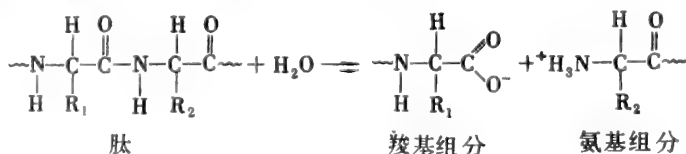


图6-1 与线状合成DNA模板结合在一起的DNA聚合酶I分子（白球）的电子显微照片。[蒙Dr. Jack Griffith 特许。]

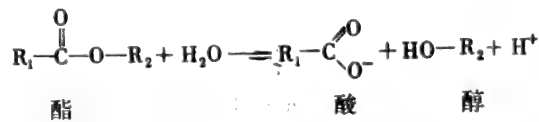
### 酶是高度专一的

酶在被催化的反应上以及在选择被称为底物的反应物上，都是高度专一的。一种酶通常催化一个单一的化学反应或一组密切相关的反应。对底物的专一程度通常是很高的，有时几乎是绝对的。

我们考虑蛋白水解酶作为一个实例。受这些酶催化的反应为肽键的水解。



大多数蛋白水解酶也催化另一种相关的反应，即酯键的水解。



蛋白水解酶在它们底物专一性的程度上可以有较大变化。枯草杆菌蛋白酶，来自某种细菌，对它所裂解的肽键邻近的侧链性质是并不怎样挑剔的。胰蛋白酶，已在第2章中提到，是相当专一的：它只在赖氨酸和精氨酸残基的羧端断裂肽键（图6-2）。凝血酶，参与血液凝块的酶，甚至比胰蛋白酶更为专一。被裂解肽键羧基一侧的侧链必须是精氨酸，而氨基一侧的应为甘氨酸（图6-3）。

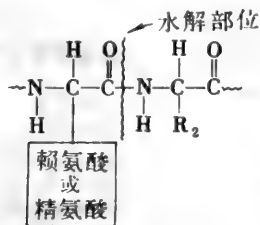


图6-2 胰蛋白酶的专一性。

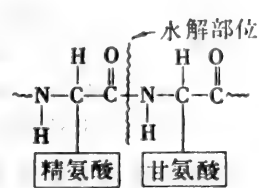


图6-3 凝血酶——一种凝块因子——的专一性。

酶高度专一性的另一实例为DNA聚合酶I。这个酶把作为构造单元的四核苷酸联接起来合成DNA。正在合成的DNA链中核苷酸的顺序，取决于另一个用作模板的DNA链中的核苷酸顺序（见图6-1）。DNA聚合酶I在执行模板给出的指令时特别精确。在新DNA链中插入一个错核苷酸的机会还不到百万分之一。

### 有些酶的活性是被调节的

有些酶先以一个无活性的前体形式合成，然后在一个生理上合适的时间和地点受到活化。消化作用酶为这种控制提供了实例。例如，胰蛋白酶原是在胰脏中合成，然后在小肠中通过断裂肽键而活化成为有活性的胰蛋白酶的（图6-4）。这种控制方式也被重复应用于导致血液凝块的酶反应系列中。蛋白水解酶没有酶活性的前体称为酶原。

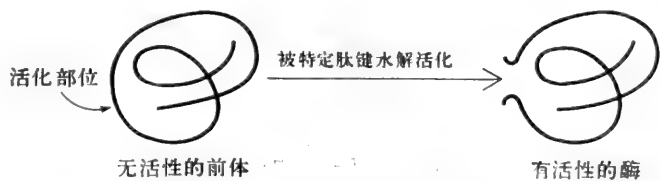
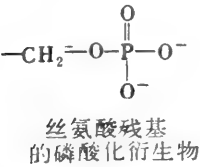


图6-4 特定肽键的水解使酶原活化。

另一种控制活性的机理是把一个较小的基因通过共价结合插入在酶上。这种控制机理称

为共价修饰。例如，合成和降解糖原的酶，它的活性是这样调节的：把一个磷酸基加到这些酶的一个特定的丝氨酸残基上（本书 279 页）。这种修饰可以通过水解来逆转。特定的酶催化磷酸基和其他修饰基的插入和脱去。



另外有一种调节机制在合成象氨基酸这样的小分子时起着作用。在这样一种生物合成的途径中，酶催化是其中的第一步，并被终产物所抑制（图 6-5）。异亮氨酸在细菌中的生物合成说明了这种称为反馈抑制的控制方式。苏氨酸在五步中转化为异亮氨酸，第一步将受苏氨酸脱氨酶所催化。这个酶在异亮氨酸浓度达到足够高水平时就被抑制。异亮氨酸结合到酶的一个调节部位上去，后者与催化部位是分开的。苏氨酸脱氨酶的抑制是以可逆的变构相互作用为媒介的。当异亮氨酸的水平下降到一定程度，苏氨酸脱氨酶又重新表现活性，从而又合成异亮氨酸了。

有些酶的专一性被置于生理控制下。乳腺合成乳糖是一个特别突出的实例（图 6-6）。催化乳糖合成的乳糖合成酶是由一个催化亚基和一个修饰亚基组成的。催化亚基不能独自合成乳糖。它的作用却在于催化半乳糖加到一个蛋白质上去的过程，后者共价结合了一个碳水化合物链。修饰亚基改变了催化亚基的专一性，使它将半乳糖与葡萄糖联接起来成为乳糖。修饰亚基的水平是由激素控制的。在怀孕期间，乳腺中生成的是催化亚基，但很少生成修饰亚基。在分娩时，激素水平有剧烈的变化，修饰亚基大量生成。修饰亚基就在催化亚基结合，生成一个有活性的乳糖

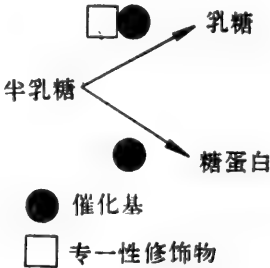
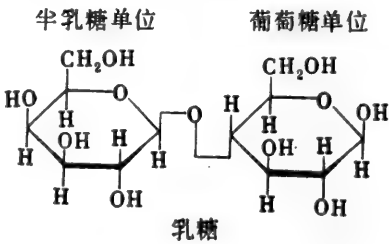


图 6-6 乳糖是一个由半乳糖和葡萄糖残基组成的糖，它被一个酶合成，这个酶包含一个催化亚基和一个专一的修饰亚基。催化亚基独自催化的反应不是合成乳糖的反应。

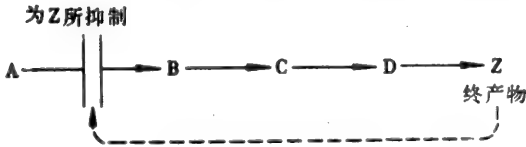


图 6-5 通过与终产物可逆地结合对途径中第一个酶进行的反馈抑制。

合成酶复合体，它生产大量乳糖。这个体系清楚地指出，激素能通过改变酶的专一性来施加它们的生理作用。

### 酶转换能量的形式

在很多生化反应中，反应物的能量以高效率转换成不同形式。例如，在光合作用中，光能转换成化学键能。在线粒体中，从食物中得出的小分子所包含的自由能被转换成另一种能量货币，即腺苷三磷酸（ATP）。ATP 的化学键能就在多种不同的方式中得到利用。在肌肉收

缩中，ATP的能量转换成机械能。细胞和细胞器通过泵利用ATP逆化学和电的梯度来运输分子和离子。这些能量的变换都由酶分子实现，它们是高度有组织集合体必不可少的组成部分。

### 酶并不改变反应的平衡

酶是催化剂，从而不能改变化学反应的平衡。这意味着一个酶对正、逆反应按同一倍数加速。考虑A和B之间互相转化。假设在没有酶的情况下正向反应的速率( $k_F$ )是 $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ，而逆向反应速率( $k_R$ )为 $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 。平衡常数 $K$ 可通过正、逆反应速率之比给出

$$A \xrightleftharpoons[10^{-6} \text{ s}^{-1}]{10^{-4} \text{ s}^{-1}} B \quad K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_F}{k_R} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

不论有没有酶起作用，B的平衡浓度为A的100倍。但没有酶时达成平衡需要几个小时，而在有酶起作用的情况下，可能还不到一秒钟就能达成平衡。因此，酶加速达成平衡，但并不移动平衡的位置。

### 酶降低受其催化的反应的活化能

化学反应 $A \rightleftharpoons B$ ，要经过一个过渡态，它比A和B的能量都要高。正反应的速率取决于温度以及A与过渡态之间的自由能差值，后者称为活化的吉布斯(Gibbs)自由能，并用符号 $\Delta G^*$ 表示(图6-7A)

$$\Delta G^* = G_{\text{过渡态}} - G_{\text{底物}}$$

反应速率正比于自由能不低于 $\Delta G^*$ 的那些分子所占的分率。而能量不低于 $\Delta G^*$ 的分子所占的比例是随温度递升的。

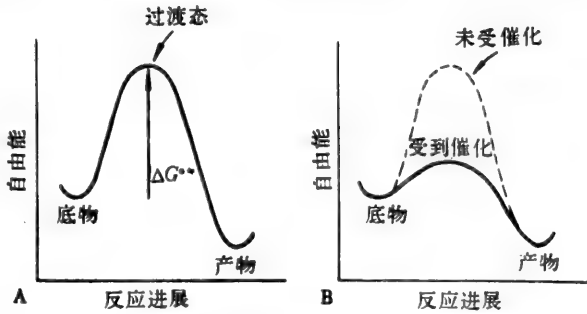


图 6-7 A. 活化的自由能 $\Delta G^*$ 的定义。B. 酶通过降低 $\Delta G^*$ 来加速催化过程。

酶通过降低 $\Delta G^*$ 来加速反应，而 $\Delta G^*$ 为活化屏障。底物和酶组合后为反应创设了一条新的途径，它的过渡态能量要比反应在没有酶的条件下进行时来得低(图6-7B)。

### 生成一个酶-底物复合体是酶催化过程的第一步

通过酶来建成和拆断化学键之前先要生成一个酶-底物(ES)复合体。底物结合在酶的一个特定区域，称为活性部位。大多数酶在结合底物时是有高度选择性的。诚然，酶的催化

专一性主要取决于结合过程的专一性。此外，酶活性的控制也发生在这个阶段。

ES复合体的存在已在各种不同的方法中得到证实：

1. ES复合体已被电子显微镜和x射线晶体学直接观察到。核酸和它们的聚合酶形成的复合体已显然可见于电子显微照片（图6-1）。关于甘氨酸L-酪氨酸作为羧肽酶A的底物所在的位置和所起的相互作用已在ES复合体的x射线研究中给出了详细信息。

2. 酶的物理性质，如它的溶解度或热稳定性，经常在形成ES复合体后发生变化。

3. 很多酶和底物的光谱特性在形成ES复合体后发生变化，正如前述脱氧血红蛋白在氧合或氧化成高铁态后吸收光谱发生明显变化（图3-18）。若酶含有一个有色的辅基时这些变化特别突出。色氨酸合成酶为一细菌酶，它含有磷酸吡哆醛辅基，为此提供一个很好的例证。这个酶催化从L-丝氨酸和吲哚合成L-色氨酸的过程。L-丝氨酸加到酶上后使磷酸吡哆醛基的荧光明显增加（图6-8）。再加上第二个底物吲哚后，使荧光猝熄到比没有底物的酶时更低的水平。因此，荧光光谱揭示了酶-丝氨酸复合体和酶-丝氨酸-吲哚复合体的存在。其他光谱学方法，如核磁和顺磁共振，也很能对ES相互作用提供信息。

4. 在生成ES复合体时表现了高度立体专一性。例如，D-丝氨酸不是色氨酸合成酶的底物。的确，D-异构体不能与酶结合。这意味着，底物结合部位具有完全确定的形状。

5. ES复合体有时可以分离成纯物质。对催化反应 $A + B \rightleftharpoons C$ 的酶来说，有时有可能分离出EA复合体。若酶对A有足够高的亲和性，而混合物中没有B的话，就可以做到。

6. 当酶的浓度不变时，反应速率随底物浓度上增而加快，直到达到最大速度时为止（图6-9）。相反，未受催化的反应并不显示这种饱和效应。在1913年，米凯利斯，L. (Leonor Michaelis) 就曾

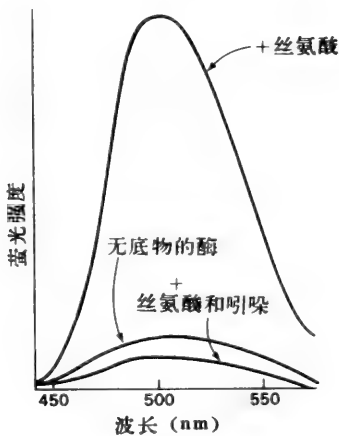


图6-8 磷酸吡哆醛基在色氨酸合成酶的活性部位上产生的荧光强度随加入底物丝氨酸和吲哚而改变的情况。

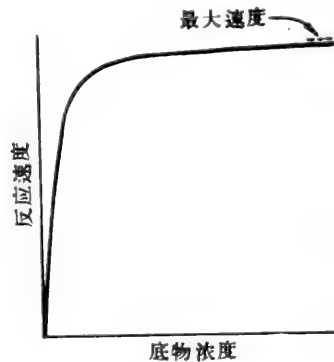


图6-9 酶催化反应的速度随底物浓度递变的函数关系。

以生成一个分立的ES复合体来解释酶催化反应的最大速度。当底物浓度足够高时，催化部位都已填满，从而反应速率达到一个最大值。这是关于存在ES复合体的最老和最普遍的证据。

### 活性部位的一些特点

酶的活性部位是结合底物（和辅基，如有辅基的话）以及提供直接参与键的形成和断裂



的残基的区域。这些残基称为催化基团。虽然酶在结构、专一性和催化模式上差别很大，关于活性部位仍可作出一系列概括：

1. 活性部位在酶的整个体积中只占比较小的一部分。酶中大多数氨基酸残基并不与底物接触。这就提出一个引人深思的问题：为什么酶要这么大？几乎所有酶都由100个以上氨基酸残基组成，它的分子量大于10kdal，直径大于25Å。

2. 活性部分是一个三维实体。酶的活性部位不是一个点，一条线，甚至也不是一个面。它是一个复杂的三维形体，由来自氨基酸顺序上不同部分的基所组成。诚然，在氨基酸顺序上隔得很远的基可以比相邻的基相互作用更强，正如已在肌红蛋白和血红蛋白中看到的那样。溶菌酶是将在下一章详加讨论的一个酶，其中活性部位上重要的基是由129个氨基酸的线性顺序中第35、52、62、63和101位残基提供的。

3. 底物是通过较弱的力结合到酶上的。ES复合体的平衡常数可变化在 $10^{-2}$ 至 $10^{-8}$  mol/L 的范围内，相当于相互作用的自由能变化在-3至-12kcal/mol 范围内。这些数值可与共价键的强度作个比较，共价键的自由能变化范围为-50至-110kcal/mol。

4. 活性部位是裂缝或裂隙。在所有已知其结构的酶中，底物分子结合在裂缝或裂隙中，通常水是进不去的，除非水本身是一个反应物。裂缝也含有几个对结合和催化来说是必需的极性残基。裂缝的非极性增进了底物的结合。此外，裂缝还创设了包容某些极性基的微环境，使它们取得对催化作用来说是必要的某些特殊性质。

5. 结合的专一性取决于活性部位中原子的确定排布方式。底物必须具有能适合活性部位的匹配外形。费希尔，E. (Emil Fischer) 关于锁和钥匙的比喻(图6-10)是在1890年提出的，已被证明为基本上是正确的，而且是一个窥探催化作用立体专一性很有成效的观点。虽然这样，较近的工作建议有些酶的活性部位并不是刚硬不变的。在这样的酶中，活性部位的形状可在结合底物时有所改变。活性部位只在底物结合上去后才有一个与底物互补的形状。这个动态辨认过程称为诱导适合(图6-11)。此外，有些酶优先与底物过渡态的一个带张力的形式结合。

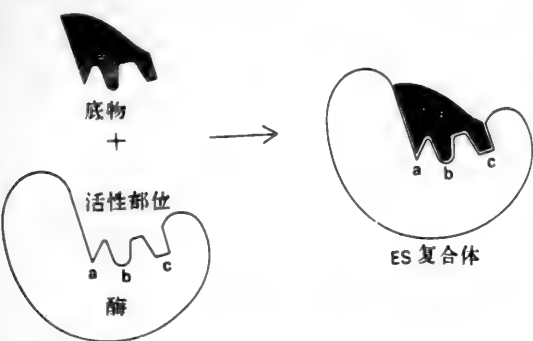


图6-10 底物与酶相互作用的锁-钥模型。酶本身的活性部位在形状上是与底物互补的。

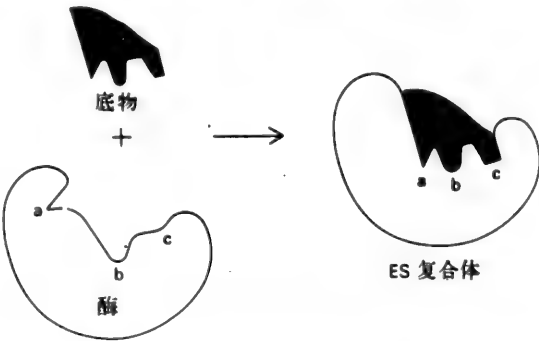


图6-11 底物和酶相互作用的诱导适合模型。酶在与底物结合后改变了形状。活性部位在形状上只在与底物结合后才与后者互补。

说明许多酶的动力学性质的米凯利斯-门顿模型

很多酶的催化速率 $V$ 随底物浓度 $[S]$ 递变的情况如图6-12中所示。当酶的浓度不变，

在[S]很小时,V与[S]几乎成正比。若[S]很高,V几乎不随[S]而改变。在1913年,米凯利斯, L. (Leonor Michaelis) 和门顿, M. (Maud Menten) 提出一个简单模型来说明这些动力学特性。他们处理这个问题中的关键是为催化过程中一个专一的 ES 复合体是一个必需的中间产物。提出的这个最简单的模型却能说明很多酶的动力学性质。这个模型为

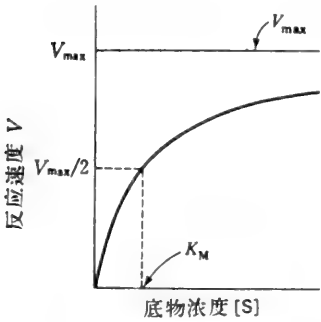
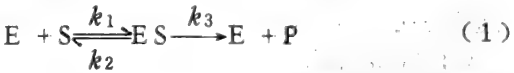


图6-12 反应速度V随底物浓度[S] 递变的图线, 这样的酶遵循米凯利斯-门顿 (Michaelis-Menten) 动力学 ( $V_{max}$  为最大速度, 而  $K_M$  为米凯利斯常数)。



酶E 与 S 结合形成 ES 复合体, 其速率常数为  $k_1$ 。ES 复合体可以有两种命运。它可以离解为 E 和 S, 速率常数为  $k_2$ , 或则进而生成产物 P, 速率常数为  $k_3$ 。这里假设产物并不进行逆向反应, 这个条件在反应的起始阶段, 产物浓度并不可观时是成立的。

我们要得出一个表示式, 使底物和酶的浓度以及各步的速率与催化过程的速率联系起来。起点是, 催化速率等于

于ES复合体的浓度与  $k_3$  的乘积:

$$V = k_3 [ES] \tag{2}$$

现在需要通过已知量将 [ES] 示出。ES 的生成和离解速率各为

$$\text{ES 的生成速率} = k_1 [E] [S] \tag{3}$$

$$\text{ES 的离解速率} = [k_2 + k_3] [ES] \tag{4}$$

我们考虑稳态条件下的催化速率。在稳态中, 中间产物的浓度保持不变, 而起始物和产物的浓度当不断改变。这种情况发生于ES复合体的生成和离解速率相等之时。在(3)和(4)式的右方之间划等号, 得

$$k_1 [E] [S] = [k_2 + k_3] [ES] \tag{5}$$

改组 (5) 式

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \tag{6}$$

定义称为米凯利斯常数的  $K_M$ :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \tag{7}$$

代入 (6) 式后, 简化成

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \tag{8}$$

现在考查一下 (8) 式的分子。若酶的浓度比底物低得多的话, 未经结合的底物的浓度 [S] 当与底物的总浓度几乎相等。未经结合的酶的浓度 [E], 则为酶的总浓度  $[E_T]$  减去 ES 复合体的浓度。

$$[E] = [E_T] - [ES] \tag{9}$$

将此式代入 (8) 中后, 得

$$[ES] = ([E_T] - [ES]) [S] / K_M \tag{10}$$

从 (10) 式中求解  $[ES]$ ，得

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]/K_M}{1 + [S]/K_M} \tag{11}$$

或

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \tag{12}$$

将此式代入 (2) 式，得

$$V = k_3 [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \tag{13}$$

最大速率  $V_{\max}$  是在酶的部位为底物所饱和时达到的，即当  $[S]$  比  $K_M$  大得多时， $[S]/([S] + K_M)$  趋近于 1。因此，得

$$V_{\max} = k_3 [E_T] \tag{14}$$

将 (14) 式代入 (13) 式中得出米凯利斯-门顿方程：

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \tag{15}$$

这个方程概括了图6-12中给出的动力学数据。当底物浓度低时， $[S]$  比  $K_M$  小得多， $V = [S]V_{\max}/K_M$ ；这就是说，速率与底物浓度成正比。而当底物浓度很高时， $[S]$  比  $K_M$  大得多， $V = V_{\max}$ ；这就是说，速率已达到最大值，就不随底物浓度改变了。

$K_M$  的含义在方程 (15) 中很明显。当  $[S] = K_M$  时， $V = V_{\max}/2$ 。因此， $K_M$  是当反应速度为最大值一半时的底物浓度。

$V_{\max}$  和  $K_M$  可以通过改变底物浓度来测定

米凯利斯常数  $K_M$  和最大速度  $V_{\max}$  很容易从不同底物浓度下的催化反应速度中引出，如果这个酶确实是按照 (1) 式给出的模式发挥作用的话。为了便于应用，可将米凯利斯-门顿

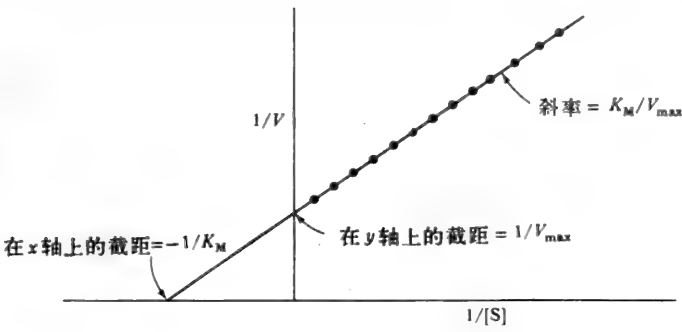


图6-13 酶动力学的双倒数图线： $1/V$  作为  $1/[S]$  的函数。斜率为  $K_M/V_{\max}$ ，在  $y$  轴上的截距为  $1/V_{\max}$ ，而在  $x$  轴上的截距为  $-1/K_M$ 。

方程变换成直线方程。这只需在方程 (15) 的两边各取倒数就可做到，并给出

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (16)$$

将 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图, 给出一个截距为 $1/V_{\max}$ 和斜率为 $K_M/V_{\max}$ 的直线 (图6-13)。

## $K_M$ 和 $V_{\max}$ 值的重要意义

酶的 $K_M$ 值变化范围很大 (表6-1)。大多数酶的 $K_M$ 介于 $10^{-1}$ 到 $10^{-6}$  mol/L之间。酶的 $K_M$ 值与具体的底物有关, 也要随环境条件, 如温度和离子强度而改变。米凯利斯常数 $K_M$ 有兩

表6-1 一些酶的 $K_M$ 值

酶	底物	$K_M$	酶	底物	$K_M$
糜蛋白酶	乙酰-L-色氨酸胺	$5 \times 10^{-3}$ mol/L	丙酮酸羧化酶	丙酮酸	$4 \times 10^{-4}$ mol/L
溶菌酶	六-N-乙酰葡萄糖胺	$6 \times 10^{-6}$ mol/L		$\text{HCO}_3^-$	$1 \times 10^{-3}$ mol/L
$\beta$ -半乳糖苷酶	乳糖	$4 \times 10^{-3}$ mol/L		ATP	$6 \times 10^{-5}$ mol/L
苏氨酸脱氨酶	苏氨酸	$5 \times 10^{-3}$ mol/L	精氨酸-tRNA合成酶	精氨酸	$3 \times 10^{-6}$ mol/L
碳酸酐酶	$\text{CO}_2$	$8 \times 10^{-3}$ mol/L		tRNA	$4 \times 10^{-7}$ mol/L
青霉素酶	苄青霉素	$5 \times 10^{-5}$ mol/L		ATP	$3 \times 10^{-4}$ mol/L

重意义。第一,  $K_M$ 是一半活性部位被充填时的底物浓度。只要 $K_M$ 已知, 在任何底物浓度下活性部位被充填的分率,  $f_{ES}$ , 可从下式算出:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (17)$$

其次,  $K_M$ 是与方程(1)中给出的催化模式中各步的速度常数相联系的。在方程(7)中,  $K_M$ 定义为 $(k_2 + k_3)/k_1$ 。考虑一个 $k_2$ 比 $k_3$ 大得多的极限情况, 这意味着, ES复合体离解成E和S要比生成E和产物快得多。在这些条件下 ( $k_2 \gg k_3$ ),

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} \quad (18)$$

ES复合体的离解常数给出如下:

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1} \quad (19)$$

换言之, 若 $k_3$ 很小于 $k_2$ 时,  $K_M$ 等于ES复合体的离解常数。当这个条件得到满足时,  $K_M$ 是ES复合体强度的一个量度:  $K_M$ 高表明弱结合;  $K_M$ 低表示强结合。这里要强调一下, 只在 $k_2$ 比 $k_3$ 大得多的条件下,  $K_M$ 才能表明ES复合体的亲和性。事实上, 多数酶是这样的, 但并非所有的酶都这样。

若活性部位浓度 $[E_T]$ 已知时, 最大速度 $V_{\max}$ 可以揭示酶的转换数, 因为

$$V_{\max} = k_3 [E_T] \quad (20)$$

例如, 碳酸酐酶的 $10^{-6}$  mol/L溶液, 若被底物充分饱和时, 每秒可催化生成0.6 mol/L  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 。因此,  $k_3$ 为 $6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 。动力学常数 $k_3$ 称为转换数。酶的转换数为在它充分被底物饱和的情况下单位时间内被转化为产物的底物分子数。碳酸酐酶的转换数 $600,000 \text{ s}^{-1}$ , 已知是最大的之一。每一轮催化反应需进行的时间为 $1/k_3$ , 在碳酸酐酶的情况下为 $1.7 \mu\text{s}$ 。大多数酶对它们生理底物的转换数的变化范围为每秒1到 $10^4$  (表6-2)。

表6-2 一些酶的最大转换数

酶	转换数 (每秒)	酶	转换数 (每秒)
碳酸酐酶	600,000	糜蛋白酶	100
3-酮类固醇异构酶	280,000	DNA聚合酶I	15
乙酰胆碱酯酶	25,000	色氨酸合成酶	2
青霉素酶	2,000	溶菌酶	0.5
乳酸脱氢酶	1,000		

### 酶催化过程中的动力学完整性： $k_{cat}/K_M$ 判据

当底物浓度比 $K_M$ 大得多时，催化反应速度等于 $k_3$ ，即为上节中所讲的转换数。但在生理条件下，大多数酶并不被底物所饱和。比值 $[S]/K_M$ 通常介于0.1到1.0之间。当 $[S] \ll K_M$ 时，酶的反应速度远远不及 $k_3$ ，因为大多数活性部位未被占据。那末有没有一个适当的参数可以表征酶在这些条件下的动力学呢？这样的参数是可以找到的，只要先把方程(2)和(8)结合后就可得出

$$V = \frac{k_3}{K_M} [E] [S] \quad (21)$$

当 $[S] \ll K_M$ 时，游离酶的浓度 $[E]$ 几乎与酶的总浓度 $[E_T]$ 相等，从而得出

$$V = \frac{k_3}{K_M} [S] [E_T] \quad (22)$$

因此，当 $[S] \ll K_M$ 时，酶反应速度取决于 $k_3/K_M$ 的值和 $[S]$ 。

对 $k_3/K_M$ 值，有没有什么物理限制？注意，这个比值取决于 $k_1$ 、 $k_2$ 和 $k_3$ ，将 $K_M$ 取代后可以得出

$$k_3/K_M = \frac{k_3 k_1}{k_2 + k_3} \quad (23)$$

比值 $k_3/K_M$ 的上限为 $k_1$ ，即生成ES复合体的速度。这个速度不可能比扩散控制的酶和底物相遇得更快。扩散限制了 $k_1$ 的数值，从而它不可能比 $10^8 - 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ L}$ 更高了。因此，比值 $k_3/K_M$ 的上限为 $10^8 - 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ L}$ 。

这个限制对具有比方程(1)更为复杂的反应途径的酶来说，也是适用的。当底物正在逐渐趋向饱和时的最大催化速度，可用 $k_{cat}$ 来代表，它要取决于几个速度常数，而并不是由 $k_3$ 单独来决定的。对这些酶来说，比值 $k_{cat}/K_M$ 是一个很恰当的参数。事实上，如乙酰胆碱酯酶、碳酸酐酶和磷酸丙糖异构酶等许多酶的比值 $k_{cat}/K_M$ 都介于 $10^8$ 到 $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ L}$ 之间，说明它们都已达到动力学的完整性。它们的催化反应速度只受它们与溶液中的底物相遇速度的限制。如要使催化速度进一步加快，只有减少扩散时间才有可能。诚然，有些酶的系列被组合在有组织的集体中（本书225页），以便一个酶的产物会很快被下一个酶找到。于是，只要把那些底物和产物隔离在一个多酶复合体的局限体积中，溶液中扩散的速度所加的限制，就可以有所克服了。

## 酶可以受特定分子抑制

通过一些特殊的小分子和离子来抑制酶的活性很重要，因为它在生物体系中是一种主要的控制机制。而且，很多药物和毒物就是通过抑制酶来起作用的。此外，酶的抑制可以成为深入理解酶的作用机制的一个途径。酶的抑制可以是可逆的，也可以是不可逆的。在不可逆抑制中，抑制剂是与酶共价结合或结合得如此牢固，以致它从酶离解得很慢。神经毒气对乙酰胆碱酯酶的作用就是一个不可逆抑制的实例，而这个受抑制的酶在传递神经冲动中起着重要作用。二异丙基氟磷酸（DIPF）与酶的活性部位上的一个关键的丝氨酸残基发生作用后生成一个没有活性的二异丙基磷酸酯酶（图6-14）。烷基化试剂如碘乙酰胺，可以通过修饰半胱氨酸和其他侧链来对酶的活性进行不可逆的抑制（图6-15）。

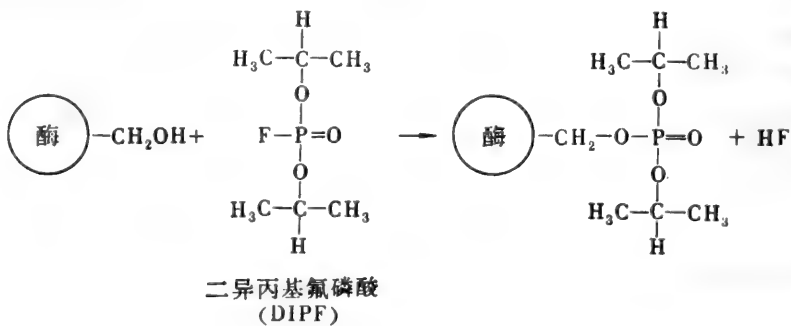


图6-14 通过二异丙基氟磷酸（DIPF）使糜蛋白酶和乙酰胆碱酯酶失去活性。

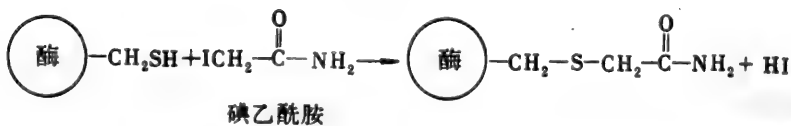


图6-15 通过碘乙酰胺使一个带有关键的半胱氨酸残基的酶失去活性。

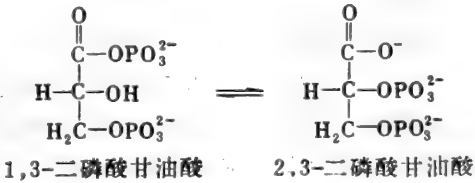
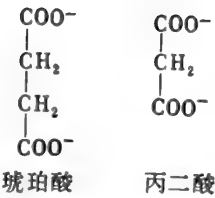
相反，可逆抑制的特征是抑制剂和酶很快达成平衡。可逆抑制中最简单的类型是竞争性抑制。



图6-16 竞争性抑制和非竞争性抑制的区别：（左）酶-底物复合体；（中）竞争性抑制剂阻止底物结合；（右）非竞争性抑制剂并不阻止底物结合。

一个竞争性抑制剂象一个底物，结合在酶的活性部位上（图6-16）。底物就不能结合到同一个活性部位上去了。换言之，结合底物和竞争性抑制剂是互相排斥的事件。一个竞争性抑制剂是靠降低与底物结合的酶分子的比例来减少催化速度的。竞争性抑制的经典实例之一为丙二酸对琥珀酸脱氢酶的作用，后者是使琥珀酸脱氢的

酶。丙二酸与琥珀酸的差别在于它只有一个而不是两个亚甲基。竞争性抑制在生理学中的重要实例是从1,3-二磷酸甘油酸生成2,3-二磷酸甘油酸的异构化反应。二磷酸甘油酸变位酶是催化这个异构化反应的酶。低水平的2,3-二磷酸甘油酸足以对它进行竞争性抑制。事实上，一个酶反应的产物，由于结构上的相似，成为底物的竞争性抑制剂的



在非竞争性抑制中，它们也是可逆的，抑制剂和底物能同时与一个酶分子结合。这意味着，它们的结合部位并不交叠。一个非竞争性抑制剂是靠减少酶的转换数，而不是靠减少结合了底物的酶的比例来起作用的。若抑制剂对底物的结合和酶的转换数都有影响，就会产生更为复杂的抑制模式了。

酶活性也可以通过寡聚体酶的不同亚基上部位之间的相互作用而受到抑制。这一类抑制称为变构抑制，在生理中很重要。不久将对此进行讨论。

### 竞争性和非竞争性抑制在动力学上是可以区别的

在不同的底物和抑制剂浓度下测量催化速度可以起到区别竞争性和非竞争性抑制的作用。在竞争性抑制中，1/V对1/[S]画出的直线不论在有或没有抑制剂的情况下，斜率虽然不同，但截距是不会改变的（图6-17）。这反映这样一个事实：V<sub>max</sub>并不因竞争性抑制而改

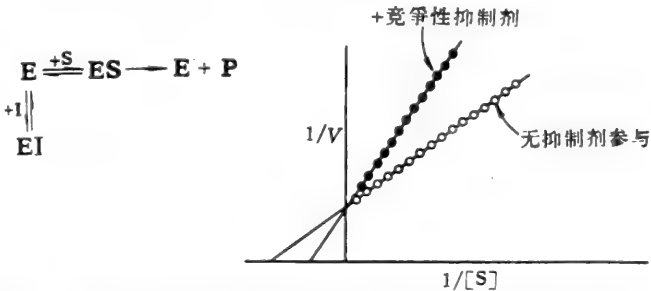


图6-17 酶动力学在有竞争性抑制剂和没有竞争性抑制剂的情况下给出的双倒数图线：V<sub>max</sub>并不改变，而K<sub>M</sub>却增加了。

变。竞争性抑制的标志是：抑制作用可以在底物浓度足够高时得到克服。底物和抑制剂竞争同一部位。在底物浓度够高时，几乎所有活性部位被底物充填，酶就能充分发挥作用。在1/V对1/[S]描出的图线上，斜率的上增代表竞争性抑制剂结合的强度。当存在竞争性抑制剂时，方程（16）为下式取代：

$$1/V = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left( \frac{1}{[S]} \right) \quad (24)$$

式中  $[I]$  为抑制剂浓度，而  $K_i$  为酶-抑制剂复合体的离解常数：

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (25)$$

换言之，图线的斜率在竞争性抑制剂存在的情况下当按因子  $(1 + [I]/K_i)$  递增。考虑一个  $K_M$  为  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  的酶。没有抑制剂时，在  $[S] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  的情况下， $V = V_{\max}/2$ 。在竞争性抑制剂的浓度为  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  时，它与酶结合的  $K_i$  为  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  时，则表现  $K_M$  当为  $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 。因此， $V = V_{\max}/4$ 。

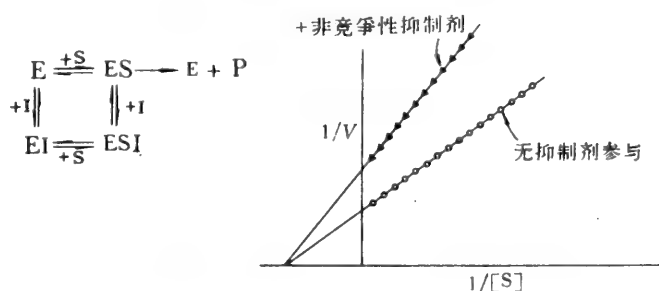


图6-18 酶动力学在有非竞争性抑制剂和没有非竞争性抑制剂时给出的双倒线图线； $K_M$ 不被非竞争性抑制剂所改变，而 $V_{\max}$ 会减小。

在非竞争性抑制（图6-18）中， $V_{\max}$ 减小了，从而在Y轴上的截距增加了。斜率，等于  $K_M/V_{\max}^I$ ，也按同一因子增加。与  $V_{\max}$  相反， $K_M$ 在这种抑制中是不会改变的。非竞争性抑制并不能靠增加底物浓度来克服。在存在非竞争性抑制剂的条件下，最大速度， $V_{\max}^I$ ，可给成

$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + [I]/K_i} \quad (26)$$

### 通过竞争性抑制治疗乙二醇中毒

每年因吸入乙二醇大约要死亡五十人。乙二醇为汽车永久性防冻剂的一个组分。乙二醇

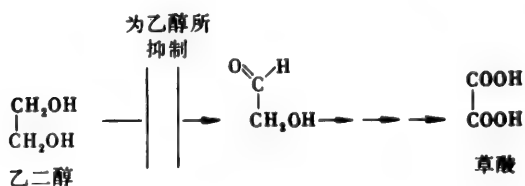


图6-19 乙醇抑制了从乙二醇生成草酸的反应。

本身并不是致命的剧毒。毒性来自草酸，它是乙二醇的氧化产物。转化的第一步是乙二醇通过乙醇脱氢酶进行的氧化反应（图6-19）。注入几乎是无毒的剂量的乙醇，可以有效地抑制这个反应。这个效应的基础在于乙醇是一个竞争性底物，从而它足以堵塞乙二醇氧化为醛类产物的途径。这样乙二醇就



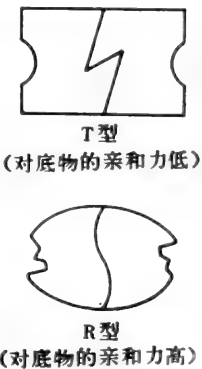
可以无害地排出体外。相同的理论基础也用在甲醇中毒的治疗上。

变构酶并不遵循米凯利斯-门顿动力学

米凯利斯-门顿模型对酶化学的发展影响很大。它的好处在于简单而应用很广。但是，很多酶的动力学性质并不能被米凯利斯-门顿模型说明。其中很重要的一类是变构酶。它们的反应速度 $V$ 对底物浓度 $[S]$ 描出的图线不是米凯利斯-门顿方程（方程（15））所预测的双曲线形，而是 $S$ 形的。回顾一下肌红蛋白的氧结合曲线是双曲线形的，而血红蛋白的却是 $S$ 形的。酶的情况颇为相似。在变构酶中，酶分子中的一个活性部位可以影响同一分子中的另一个活性部位。这种跨越亚基的相互作用产生的可能结果是底物的结合中有协同效应，从而为 $V$ 对 $[S]$ 给出 $S$ 形的图线。此外，变构酶的活性可以因调节分子而改变，后者结合在催化部位以外的部位上，正如血红蛋白结合氧时要受 $DPG$ 、 $H^+$ 和 $CO_2$ 所影响。

变构相互作用的协同模型

1965年莫诺德，J.（Jacques Monod），怀曼，J.（Jeffries Wyman）和钱格斯，J.-P.（Jean-Pierre Changeux）为变构酶提出了一个精致而深透的模型。我们把他们的看法应用到由两个相同的亚基组成的酶上，每个亚基各有一个活性部位。假设亚基可以存在于两种名称为 $R$ 和 $T$ 的构象中。 $R$ （松弛）态对底物有较高亲和性，而 $T$ （紧张）态的亲合性较低（图6-20）。回顾一下这些名称是用来描述血红蛋白两种交替的四级结构的（本书 57 页） $R$ 和 $T$ 型是可以互相转化的。这个模型的一个重要假设是，两个亚基必须在同一构象状态中，以便使二聚体的对称性得以保存。这样， $RR$ 和 $TT$ 是允许的构象，而 $RT$ 是不允许的。在没有底物时，两个允许的状态用记号 $T_0$ 和 $R_0$ 来表示，而 $L$ 是它们的浓度比。



$$R_0 \rightleftharpoons T_0 \tag{27}$$

$$L = T_0 / R_0 \tag{28}$$

为简单计，我们假设，底物并不与 $T$ 态结合。二聚体的 $R$ 态可以结合一个或两个底物分子，分别用 $R_1$ 或 $R_2$ 来代表。

$$R_0 + S \rightleftharpoons R_1 \tag{29}$$

$$R_1 + S \rightleftharpoons R_2 \tag{30}$$

$$K_R = \frac{2 [R_0] [S]}{[R_1]} = \frac{[R_1] [S]}{2 R_2} \tag{31}$$

在这个模型中，对第一和第二个底物分子结合到二聚酶分子的 $R$ 型上去的微观离解常数 $K_R$ 是相同的。方程（31）中的因子2是为了照顾到这样两个事实：一个底物可以在 $R_0$ 的两个部位中任选一个来结合以及按照同样的道理，底物可以从 $R_2$ 的两个部位中任何一个脱下来成为 $R_1$ 型。

我们需要一个给出分数饱和度 $Y$ 的示式，把结合了底物的活性部位所占的分率作为底物浓度的函数表示出来。

$$Y = \frac{[\text{被占部位}]}{[\text{全部部位}]} = \frac{[R_1] + 2[R_2]}{2([T_0] + [R_0] + [R_1] + [R_2])} \quad (32)$$

将方程 (27) 通过 (31) 代入 (32) 中后得所求的  $Y$  示式:

$$Y = \left( \frac{[S]}{K_R} \right) \frac{1 + [S]/K_R}{L + (1 + [S]/K_R)^2} \quad (33)$$

我们按  $K_R = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  和  $L = 10^4$  画出方程 (33) 的图线。这样画出的  $Y$  对  $[S]$  的图线是  $S$  型, 而不是双曲线型的 (见下页图 6-23)。换言之, 底物的结合是协同进行的。若每个活性部位的转换数对  $R_1$  和  $R_2$  中的  $ES$  复合体是相同的话, 那末反应速度对底物浓度画出的图线将是  $S$  形的, 因为

$$V = Y V_{\max} \quad (34)$$

我们要看看这个结合过程 (图 6-21)。没有底物时, 几乎所有酶分子都在  $T$  型。说得具体一些, 在上面的实例中, 每  $10^4$  个在  $T$  型中的分子, 只有一个分子在  $R$  型中。加入底物使构象平衡向  $R$  型的方向移动, 因为底物只与  $R$  型结合。当底物与一个部位结合时, 根据这个模型的基本假设, 同一个酶分子中的另一个部位也必须在  $R$  型中。换言之, 从  $T$  向  $R$  的转化或反过来, 是协调的。因此, 酶分子在  $R$  型中的比例随底物的逐渐加入而越来越快地上升, 从而底物的结合是协同进行的。当活性部位已被充分饱和时, 所有酶分子都进入  $R$  型。

变构激活剂和抑制剂的效应可以通过协调模型很好地说明。变构抑制剂优先与  $T$  型结合, 而变构激活剂则优先与  $R$  型结合 (图 6-22)。因此, 变构抑制剂将  $R \rightleftharpoons T$  构象平衡推向  $T$ , 而变构激活剂将它推向  $R$ 。通过变构平衡常数  $L$  的变化可以定量地表达出这些效应, 而  $L$  在方程 (33) 中为一个变量。变构抑制剂使  $L$  增加, 而变构激活剂使  $L$  减小。这些效应示出于图 6-23 中, 那里  $Y$  对  $[S]$  按  $L$  的这样一些数值作图:  $10^3$  (有激活剂),  $10^4$  (无激活剂也无抑制剂) 和  $10^5$  (有抑制剂)。分数饱和度  $Y$  在  $[S]$  的任何数值下, 都随抑制剂的存在而下降, 并随激活剂上升。

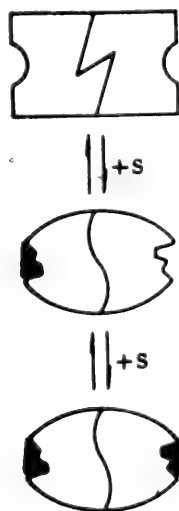
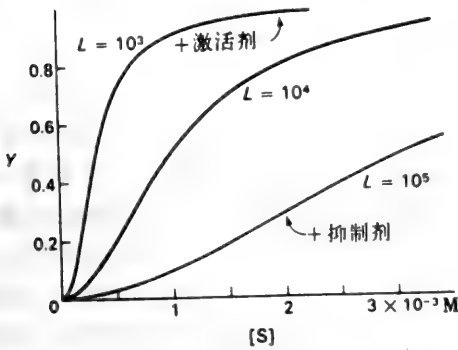


图 6-21 一个变构酶中协同结合底物的协调模型。



图 6-22 在协调模型中, 变构抑制剂 (用六角形代表) 稳定  $T$  态, 而变构激活剂 (用三角形代表) 稳定  $R$  态。

这里要定义两个有用的术语。同向效应指相同配位体（被结合的分子或离子）之间的变



构相互作用，而异向效应指不同配位体之间的相互作用。在前面的实例中，底物与酶的协同结合是一种同向效应。相反，激活剂或抑制剂对底物结合所产生的效应是异向效应，因为相互作用发生在不同种类的分子之间。在变构相互作用的协调模型中，同向效应总是积极的（协同的），而异向效应既可以是积极的，也可以是消极的。

图6-23 根据协调模型，饱和度Y随底物浓度[S]递变的函数关系〔方程(33)〕。变构激活剂和抑制剂的效应也被示出。

## 变构相互作用的循序模型

变构相互作用也可以用循序模型予以说明，它是由科什兰，D. (Daniel Koshland, Jr.) 发展起来的。对这个模型的最简单形式作了三个假设：

1. 每个亚基只有两种可及的构象状态（R 和 T）。
2. 底物结合可以改变被结合的亚基的形状。但是，酶分子中其他亚基并不怎样改变。
3. 在一个亚基中结合底物所引起的构象变化可以增加或减少同一酶分子中其他亚基的底物结合亲和性。

循序模型为变构酶中进行的结合过程给出的图象，如图6-24中所示。如R T 对底物的亲和性比T T 的大，结合是协同进行的。

简单循序模型与协调模型有几个不同之处。第一，前者并未假定在无底物时R 和T 型达成平衡。更确切地说，从构象T 到R 的转化是底物结合所引发的。其次，酶分子不同亚基中构象T 到R 的转化是循序的，而不是协同的。杂化体R T 在循序模型中，作用是突出的，但在协调模型中却被排除在外。协调模型假设对称性对蛋白质寡聚体中亚基之间的相互作用来说是必要的，从而要求在变构转化中得以保存。相反，在循序模型中假设，亚基即使在不同的构象状态中也可以发生相互作用。最后，这两个模型的差别在于同向相互作用在协调模型中必须是积极的，但在循序模型中却既可以是积极的，也可以是消极的。究竟第二个底物分子可以比第一个结合得更牢固或不那么牢固，要看结合第一个底物分子所引起的畸变的本质。

哪个模型是正确的？对有些变构蛋白来说，协调模型很适合，而对另一些，循序模型似乎很用得上。但是，对另一类变构蛋白来说，哪个模型都难以满意。对这些蛋白质来说，认为只有两种重要构象状态（R 和 T）的假说显得是太局限了。就需要更为复杂的模型才能说明这些蛋白质的变构性质了。

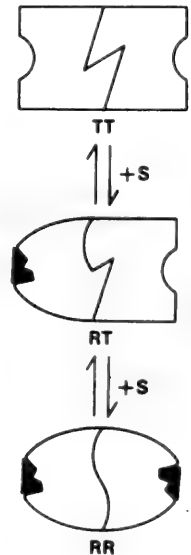


图6-24 变构酶中底物进行协同结合的循序模型。R T 中的空活性部位对底物的亲和性要比T T 中的空位高。

## 酶-底物复合体中的静电键、氢键和范德瓦耳键

生物体系中可逆的分子相互作用是以三种不同的力为媒介的。大分子的折叠、底物与酶的结合和细胞间的相互作用——诚然，生物体系中一切分子的相互作用——都要求静电键、氢键和范德瓦耳键的相互影响。这三种基本的非共价键在几何要求、强度和专一性上是不同的。此外，它们以不同方式被具有深刻影响的水所作用。我们逐个考虑一下这三种基本键型的特性。

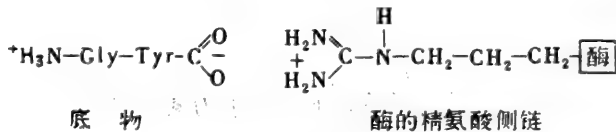
### 带电的底物能与酶上带相反电荷的基团相结合

底物上带电的基团与酶上带相反电荷的基团相互作用。这样的静电相互作用的力由库仑 (Coulomb) 定律给出：

$$F = \frac{q_1 q_2}{r^2 D}$$

式中 $q_1$ 和 $q_2$ 为两个基的电荷， $r$ 为它们之间的距离，而 $D$ 为介质的介电常数。静电相互作用在( $D = 1$ 的)真空中为最强，而在象水( $D = 80$ )这样的介质中为最弱。

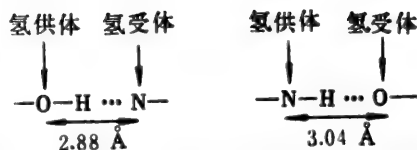
甘氨酸-L-酪氨酸与羧肽酶A之间的结合是静电相互作用的一个实例。而羧肽酶A是裂解羧基末端残基的蛋白水解酶。二肽底物带负电的羧酸基与酶的一个精氨酸残基的带正电的胍基之间起相互作用。这两个带相反电荷的基团之间的距离为2.8Å。



这种相互作用也叫离子键、盐键、盐桥或离子对。所有这些术语具有同一含义：带相反电荷的基团之间的静电相互作用。带负电的底物能与赖氨酸或精氨酸残基带正电的侧链形成静电键。组氨酸残基的咪唑基和末端氨基也是一个带负电的底物的潜在结合部位，如果它们的 $pK$ 能使它们在介质的 $pH$ 下带正电的话。对于一个带正电的底物，酶上的潜在结合部位是天冬氨酸和谷氨酸的羧酸基以及多肽链的末端羧酸。

### 底物通过精确定向的氢键与酶结合

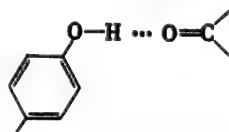
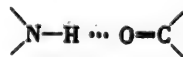
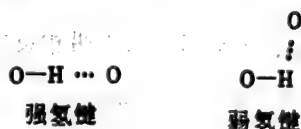
很多底物不带电荷，但它们以高亲和性和专一性与酶相结合。对这些底物，也包括大多数带电荷的底物在内，很重要的一种相互作用是氢键。在氢键中，一个氢原子为其他两个原子所分享。与氢原子结合较紧的原子称为氢供体，而另一个原子称为氢受体。实际上，氢键可以认为是质子从酸转移到碱的中间体。受体原子带有吸引氢原子的部分负电荷。简言之，氢键令人想起三口之家的情况。



生物体系中氢键的供体原子是一个与氢原子形成共价键的氧或氮原子。受体原子可以是氧或氮。形成氢键的种类和它们的键长给出于表6-3中。键能约在3—7 kcal/mol的范围内变化。氢键比范德瓦耳键要强，但比共价键要弱得多。氢键的长度介于共价键和范氏键之间。氢键的一个重要特征在于它们具有方向性。最强的氢键是供体、氢和受体原子都在同一直线上的。如果受体原子与供体和氢原子连成的直线成一角度，氢键随角度增大而变弱。

表6-3 典型氢键距离

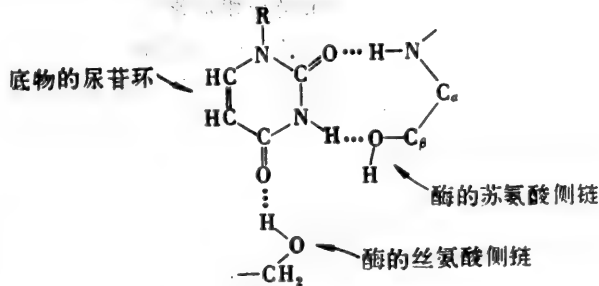
键	距离 (Å)
O—H...O	2.70
O—H...O	2.63
O—H...N	2.88
N—H...O	3.04
N <sup>+</sup> —H...O	2.93
N—H...N	3.10



在讨论肌红蛋白和血红蛋白结构时已经遇到了氢键。在 $\alpha$ 螺旋中，肽的—NH和—C O基互相形成氢键。氮原子为氢供体，而氧原子为氢受体。氮和氧原子之间的距离为2.9 Å。氢原子对氮原子要比对氧原子接近0.9 Å。

肌红蛋白和血红蛋白中氢键的另一个实例为酪氨酸H C 2的羧基和FG4的肽羰基之间的键。酪氨酸羟基的氧原子是氢供体。而肽羰基的氧原子为氢受体。

氢键在底物与酶的相互作用中担当的角色，可以通过底物的尿苷部分与胰核糖核酸酶的结合来很好地予以说明，后者为裂解核糖核酸的酶（图6-25）。这里涉及三个氢键：



1. 尿苷环有一个C = O基与肽的N—H结成氢键。

2. 尿苷环的N—H基与苏氨酸残基的—O H基结成氢键。

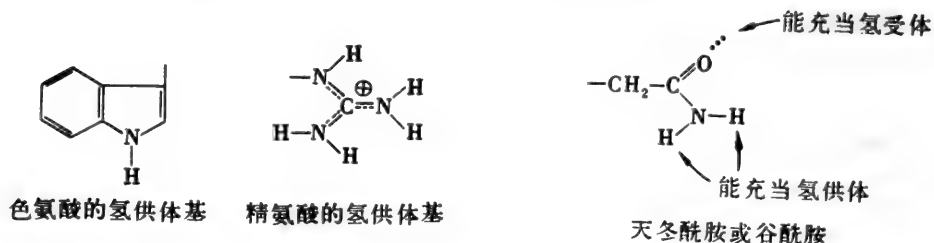
3. 另一个环C = O基与丝氨酸残基的—O H基结成氢键。

图6-25 底物与核糖核酸酶结合中的氢键相互作用 [依据F. M. Richards, H. W. Wyckoff和N. Allewell. In *The Neurosciences: Second Study Program*, F. O. Schmitt, ed. (Rockefeller University Press, 1970), P. 970.]

## 蛋白质富有结合氢键的能力

氨基酸侧链和肽主链能形成各式各样的氢键。事实上，20个基本氨基酸中有11个能通过它们的侧链形成氢键。这些残基，按其形成氢键的种类，可以分成三类。

1. 色氨酸和精氨酸的侧链只能充当氢键供体。
2. 天冬酰胺，谷酰胺，丝氨酸和苏氨酸能充当氢键供体和受体，正如肽基那样。



3. 赖氨酸（和末端氨基），天冬氨酸和谷氨酸（和末端羧基），酪氨酸和组氨酸生成氢键的能力随pH而改变。这些基在某个pH范围内可以兼任氢键受体和供体，而在其他pH值下只能充当受体或供体（但不能兼任两者），正如图6-26中为天冬氨酸和谷氨酸示出的那样。这些可电离基形成氢键的方式当随pH而定。

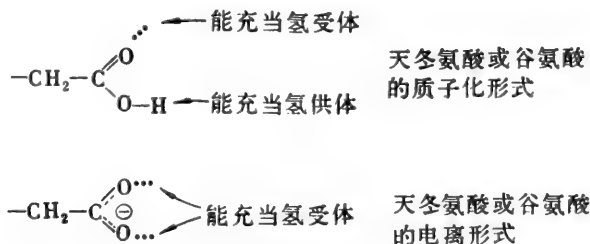


图6-26 天冬氨酸和谷氨酸形成氢键的能力。

## 在有立体互补性时范氏相互作用起重要作用

当两个原子相隔约3至4 Å时，它们之间就有非专一性的吸引力。这种相互作用称为范氏键，比静电键和氢键要弱，也不如它们专一，但在生物学中的重要性一点不在它们之下。范氏键的基础在于电荷围绕原子的分布随时间而改变。在任一瞬间，电荷的分布并不是完全对称的。电荷分布在原子周围的这个瞬时不对称性将改变电子在邻近原子中的分布。一对原子越来越接近时，它们之间的吸引力不断增大，直到它们已接近到范氏接触距离后为止（图6-27）。距离更短时，很强的排斥力就占了上风，因为外电子云已经交叠了。例如氧与碳原子间的接触距离为3.4 Å，可从1.4和2.0 Å相加后得出，而它们各为O和C原子的接触半径。

一对原子间的范氏键能约为1 kcal/mol。这要比氢键或静电键弱得相当多，而后的键能

范围为3—7kcal/mol。因此，单个范氏键算不了什么。它的强度只比室温下分子的平均热能(0.6kcal/mol)略高。只有当底物的很多原子与酶的很多原子接近时，范氏力才在结合中发挥重要作用。而当一对原子间的距离比它们的接触距离那怕只超过1 Å，范氏力就会很快消失。只有当底物和酶的形状匹配时，相互作用才能产生在它们的较多原子之间。换言之，底物和酶之间的相互作用只有当它们立体互补时才能发生。因此，在单个范氏相互作用中几乎没有什么专一性可讲，而当有机会同时形成大量范氏键时专一性就冒头了。比范氏接触距离更要接近的原子之间的排斥力在产生专一性中是与吸引力同样重要的。

表6-4 原子的范氏接触半径

原 子	半径 (Å)
H	1.2
C	2.0
N	1.5
O	1.4
S	1.85
P	1.9

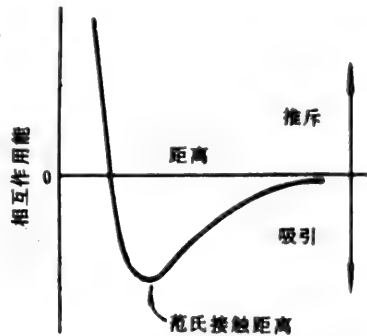
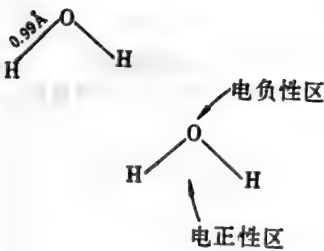


图6-27 范氏相互作用能作为两个原子间距离的函数。

### 水在生物学上的重要性质是它的极性和内聚性

迄今还没有考虑水对前述三种基本键型的作用。事实上，水在生物学中积极参与分子相互作用。水在这方面有两个特别重要的性质：



1. 水是极性分子。分子的形状为三角形，而不是直线型，从而电荷分布是不对称的。氧核将电子从氢核引离，使后者周围成为带正电荷的区域。若用四面体来表示氧原子的话，氢核在其中两个角上，而另外两个角是电负性的。水分子从而是一个在电方面的极性结构。

2. 水分子相互间具有高亲和性。在一群集聚在一起的水分子中，一个分子的带正电区域倾向于朝着它的一个邻近分子中带负电的区域。它两个电负性区域中的每一个

吸引邻近分子中的一个质子。而它自己的两个质子各吸引一个邻近分子的氧端。因此，每个氧原子处在其他氧原子形成的四面体的中心上，O—O距离为2.76 Å。

冰的一种结构示出于图6-28中。当冰熔化时，它的很有规则的晶态结构将在多处破损。但是，只有约15%的键被切断。在液态的水中，每个H<sub>2</sub>O平均与3.4个邻居形成氢键。因此，液态水具有不完全的有序结构。氢键结合而成的集聚体不断形成和不断拆散。水的突出的特点是它能自身互相成键。当然，形成某一氧原子周围氢键正端的质子，在数目上是与形成负端的不共享电子对相等的。这些键的四面体排布

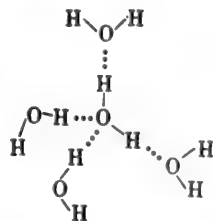


图6-28 一种冰的结构。

产生范围广泛的三维结构。水是高度内聚的。

水减弱了极性相互作用

水的极性和形成氢键的能力使它成为相互作用很强的分子。其后果是水减弱了其他分子之间的静电和氢键相互作用。水在这些极性相互作用中是一个强有力的竞争者。考虑一下水对羰基和酰胺基形成氢键所产生的作用（图6-29）。水的氢原子可以取代NH基作为氢键供体，而水的氧原子能取代羰基的氧。因此，只有当水被排除在外时，CO和NH基间才能发生较强的氢键相互作用。

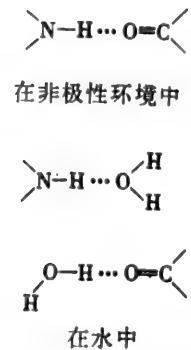


图6-29 水为结合氢键而竞争。

水使静电相互作用的强度，比在真空中减弱到80分之一，而80为水的介电常数。水的高介电常数表达了它的极性和它在离子周围形成一个定向溶剂层的能力。这会减弱离子间的静电相互作用（图6-30）。这些定向溶剂层产生它们自己的电场，与离子产生的电场相抗衡。后果在于这些离子的静电相互作用被明显削弱了。水的介电常数是特别高的。

表6-5 某些溶剂的介电常数

物 质	介电常数 (20℃)
己烷	1.9
苯	2.3
二乙醚	4.3
氯仿	5.1
丙酮	21.4
乙醇	24
甲醇	33
水	80
氢氟酸	116

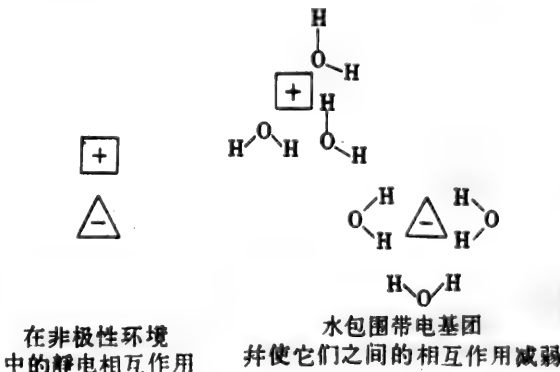


图6-30 水减弱了带电基团之间的静电相互作用。

疏水性相互作用：非极性基团在水中倾向缔合

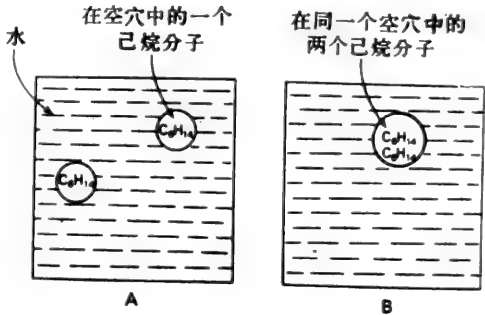
在水中分散的油滴会形成单个大油滴，是一种习以为常的现象。在原子水平上有一个类似的过程：非极性分子或基团在水中倾向于集聚成簇。这些缔合作用称为疏水性相互作用。说得形象一些，水倾向于把非极性分子拥挤在一起。

让我们审查一下疏水性相互作用的基础，而这种作用是大分子的折叠、底物与酶结合以及生物体系中很多其他分子相互作用的主要推动力。考虑将一个象己烷这样的非极性分子引入水中。造成了一个空穴，它短暂地切断了水分子间的一些氢键。被置换的水分子然后重新定向来形成最多可能的新的氢键。但这仍须付出一定代价：在己烷分子周围的水笼中形成稳定氢键的方式毕竟要比纯水中受到更多限制。己烷周围的水分子要比溶液中其他地方更有秩序，



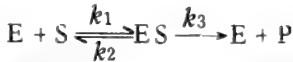
从而溶液的熵有所减少。现在我们考虑水中两个己烷分子的排布。它们会不会占据两个小空穴（图6-31A）或在单个较大的空穴中（图6-31B）？实验事实是两个己烷分子聚在一起占据单个较大的空穴。这种缔合被一些围绕两个隔离的己烷分子的定向水分子的释放所推动。因此，疏水性相互作用的基础是水分子释放出来后自由度增加所产生的熵增加。非极性溶质分子在水里被挤在一起，主要不是因为它们相互之间亲和性高，而因为水本身相互间结合较强。

图6-31 两个己烷分子在水的微小体积中：（A）己烷分子在水结构中占据不同的空穴和（B）它们占据同一空穴，这在能量上更为有利。



### 概 要

生物体系中的催化剂是酶，它们全都是蛋白质。酶是高度专一的，并具有极大的催化能力。它们通常提高反应速度至少  $10^7$  倍。酶并不改变化学平衡。更确切地说，它们靠降低化学反应的活化能来起催化剂的作用。Michaelis-Menten模型说明了某些酶的动力学性质。在这个模型中，酶(E)与底物(S)结合而形成酶-底物(ES)复合体，它能进一步生成产物(P)或离解为E和S。



生成产物的速度(V)通过Michaelis-Menten方程给出：

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

式中  $V_{\max}$  为酶被底物充分饱和时的速度，而  $K_M$  为 Michaelis 常数，即当反应速度为最大速度一半时的底物浓度。最大速度  $V_{\max}$ ，等于  $k_3$  和酶的总浓度的乘积。动力学常数  $k_3$ ，称为转换数，为当酶被底物充分饱和后在单个催化部位每单位时间内转化成产物的底物分子数。对大多数酶来说，转换数介于每秒 1 到  $10^4$  之间。

酶能被专一小分子或离子所抑制。在不可逆抑制中，抑制剂与酶共价连结或结合得很紧，以致从酶离解得很慢。对比之下，可逆抑制的特征为酶与抑制剂之间很快达成平衡。竞争性抑制剂阻止底物与活性部位结合。它靠降低与底物结合的酶分子所占的比例来减小反应速度。在非竞争性抑制中，抑制剂降低转换数。竞争性抑制可以从提高底物浓度能否克服抑制来与非竞争性抑制区别开来。

很多酶的催化活性在活体中得到调节。变构相互作用定义为空间上隔离的部位之间的相互作用，这一点特别重要。所有已知变构酶由两个或更多亚基组成。变构相互作用是以从一个亚基传递到另一个亚基的构象变化为媒介的。变构酶通常给出 S 型，而不是双曲线型的 V 对 [S] 的图线。两个极限模型，即协调模型和循序模型，曾被假设来说明这些酶的一些性质。

生物体系中的可逆的分子相互作用起源于静电键、氢键和范氏键。水的存在对这些相互

作用有深刻影响。水的一些重要特征在于它的极性，既充当氢供体，又充当氢受体的能力以及内聚性。因此，水减弱其他分子和离子之间的静电键和氢键的强度。相反，水加强了非极性分子间的相互作用。底物结合在酶的活性部位沟隙中，当底物结合上去后水是大部分要被排挤出去的。水被排斥在外，加强了酶和底物之间的静电键和氢键。结合能的一个重要部分来自底物与活性部位两者的非极性部分之间的缔合作用。酶-底物相互作用的专一性来自具有高度定向性的氢键以及要求底物分子与之互补的活性部位的形状。很多酶对底物的识别是一个为酶的活性部位构象变化所伴随的动态过程。

习 题

1. 在推进生物合成反应，如DNA的合成时，焦磷酸水解成正磷酸很重要。在大肠杆菌中这个水解反应为焦磷酸酶所催化，后者的分子量为120kda1，由六个相同的亚基组成。酶提纯后的 $V_{max}$ 为每毫克酶2800单位。对这个酶，一个活性的单位定义为在37℃和15分钟内在标准测定条件下水解10 $\mu$ mol 焦磷酸所需的酶量。
- (a) 当底物的浓度比 $K_M$ 大得多时，每毫克酶每秒钟水解多少摩尔底物？
- (b) 1 mg酶中活性部位有多少摩尔？假设每个亚基有一个活性部位。
- (c) 酶的转换数多大？将此数值与本章提到的其他数值进行对比。
2. 青霉素被青霉素酶水解，从而被失活。青霉素酶存在于一些有抗性的细菌中。在金黄色葡萄球菌中这种酶的分子量为29.6kda1。在一个10ml含有10<sup>-9</sup>g纯化青霉素酶的溶液中每分钟水解青霉素的量，作为青霉素浓度的一个函数进行了测量。假设青霉素浓度在测定中并不怎样变化。

[青霉素]	水解量(mol)
$0.1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$0.11 \times 10^{-9}$
$0.3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$0.25 \times 10^{-9}$
$0.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$0.34 \times 10^{-9}$
$1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$0.45 \times 10^{-9}$
$3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$0.58 \times 10^{-9}$
$5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$0.61 \times 10^{-9}$

- (a) 利用这数据作1/ $V$ 对1/[S]的图线。青霉素酶是否遵守米凯利斯-门顿(Michaelis-Menten)动力学？如果遵循的话， $K_M$ 的值为多少？
- (b)  $V_{max}$ 的值有多大？
- (c) 在这些实验条件下青霉素酶的转换数有多大？假设每个酶分子有一个活性部位。
3. 在有和没有 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 抑制剂(I)的情况下作为底物浓度函数来测量酶的动力学。

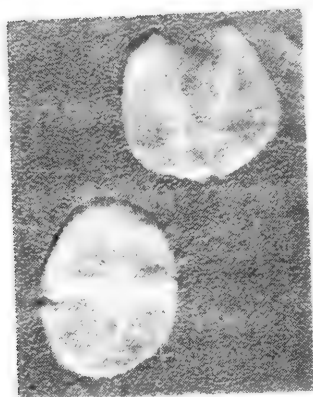
[S]	速度( $\mu \text{ mol/min}$ )	
	无抑制剂	有抑制剂
$0.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$	10.4	4.1
$0.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$	14.5	6.4
$1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$	22.5	11.3
$3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$	33.8	22.6
$9.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$	40.5	33.8

- (a) 没有抑制剂时， $V_{max}$ 和 $K_M$ 的数值有多大？存在抑制剂时多大？

- (b) 这属于哪一种抑制作用?
- (c) 这个抑制剂的结合常数有多大?
- (d) 若  $[S] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  和  $[I] = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ , 结合了底物的酶分子占多少分率? 结合了抑制剂的占多少分率?
- (e) 若  $[S] = 3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , 在有和没有  $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  抑制剂时结合底物的酶分子占多少分率? 将此比值与同一条件下反应速度的比值进行对比。
4. 习题 3 中讨论的酶, 在存在另一个抑制剂时测量其动力学。这个抑制剂的浓度为  $10^{-4} \text{ mol/L}$ 。
- | [S]                                | 速度 ( $\mu\text{mol/min}$ ) |      |
|------------------------------------|----------------------------|------|
|                                    | 无抑制剂                       | 有抑制剂 |
| $0.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ | 10.4                       | 2.1  |
| $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ | 14.5                       | 2.9  |
| $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ | 22.5                       | 4.5  |
| $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ | 33.8                       | 6.8  |
| $9.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ | 40.5                       | 8.1  |
- (a) 在有抑制剂时  $V_{\max}$  和  $K_M$  有多大? 与习题 3 得出的数值进行对比。
- (b) 抑制属于何种型式?
- (c) 这个抑制剂的离解常数有多大?
- (d) 若  $[S] = 3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , 在有和没有  $10^{-4} \text{ mol/L}$  抑制剂的情况下, 与底物结合的酶分子占多大分率?
5. 将  $1/V$  对  $1/[S]$  作出的图线有时称为 Lineweaver-Burk 图线。另一种表达动力学数据的方法是将  $V$  对  $V/[S]$  作图, 所得的为 Eadie-Hofstee 图线。
- (a) 重排米凯利斯-门顿 (Michaelis-Menten) 方程, 得出  $V$  作为  $V/[S]$  的一个函数。
- (b)  $V$  对  $V/[S]$  所作图线的斜率、 $y$  截距和  $x$  截距各有何意义?
- (c) 在没有抑制剂、有一个竞争性抑制剂以及有一个非竞争性抑制剂的情况下作图示出  $V$  对  $V/[S]$  的关系。
6. 对变构酶来说, 竞争性抑制剂浓度低时, 常充当激活剂。为什么? (提示: 考虑 CO-血红蛋白的类比。)
7. 激素黄体酮包含两个酮基。对识别黄体酮的受体蛋白质的性质所知极少。在 pH 7 下, 哪些氨基酸的侧链可能与黄体酮形成氢键? (假设受体蛋白中的侧链与溶液中的氨基酸侧链具有相同的  $pK$ 。)
8. 设想两个底物 A 和 B 竞争一个酶。引出式使 A 和 B 的利用速度之比,  $V_A/V_B$  与这些底物的浓度和它们的  $k_3$  和  $K_M$  值联系起来。(提示: 对底物 A, 以  $V_A$  为  $k_3/K_M$  的函数表达, 为  $V_B$  引出同样的关系。)
- 专一性是否由  $K_M$  单独决定?
- 另外的习题参看 W. B. Wood, J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), chs. 6 and 7; and R. Montgomery and C. A. Swenson, *Quantitative Problems in the Biochemical Sciences*, 2nd ed. (Freeman, 1976), ch. 11.

## 第7章 酶作用的机制：溶菌酶和羧肽酶

在1922年，伦敦的一个细菌学家弗莱明，A. (Alexander Fleming)，有一次得了感冒。他是那怕一刻光阴也舍不得糟蹋的人，就利用感冒作为进行一个实验的机会。他让自己把几滴鼻粘液掉在含有细菌的培养玻片上。过了一些时候，当他发现粘液附近的细菌已被溶解掉时感到很激动，就想到粘液中可能含有他正在寻找的那种普遍适用的抗生素。弗莱明揭示，这种抗菌物质是一种酶，被他命名为lysozyme (溶菌酶)——lyso因为它那溶解细菌的能力，而 zyme因为它是一个酶。他也发现一种小圆形细菌对溶菌酶特别敏感，这种细菌是能显示溶解的微球菌，从而被命名为 *Micrococcus lysodeikticus* (deiktikos的意思是能显示)。



弗莱明发现，眼泪是溶菌酶的一个丰富来源。被喷射少量柠檬液——经历“柠檬苦难”后，志愿者就能提供泪液。圣玛利医院院刊发表一张漫画，画出小孩为了几个便士来到弗莱明的实验室，他手下有一个人管喷射，另一个人管收集泪液！弗莱明很失望，他发现溶菌酶对最有害的细菌起不了什么作用。但在七年以后，他发现一种高度有效的抗生素：青霉素——生动地证示了巴斯德 (Pasteur) 的名言：机会不辜负有心人。

图7-1 能显示溶解的微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 中分离出来的细胞壁的电子显微照片。[蒙Dr. Nathan Sharon特许。]

### 溶菌酶裂解细菌的细胞壁

溶菌酶靠裂解某些细菌细胞壁的多糖组分来溶解它们。细菌中细胞壁的功能在于提供机械支持。细菌去掉胞壁后一般是要胀破的，因为细胞内部渗透压高。细菌胞壁的细致结构将在后面的章节中讨论。让我们在这里先

考虑多糖部分的结构。

胞壁多糖是由两种糖组成：**N-乙酰葡萄糖胺 (NAG)** 和 **N-乙酰胞壁酸 (NAM)**。NAM和NAG都是氨基葡萄糖的衍生物，其中氨基已被乙酰化(图7-2)。在NAM中，一个乳酰基侧链通过醚键与糖环的C-3相连接。在细菌胞壁，NAM和NAG是通过一个糖的C-1和另一个糖的C-4之间的糖苷键相连，而糖

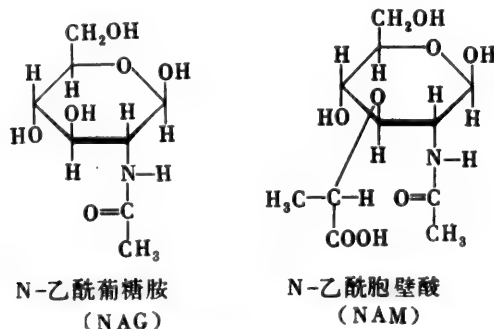


图7-2 细菌胞壁多糖中的糖残基。

苷键中的氧原子可以定位于糖环平面的上方或下方。在 $\alpha$ 构型中，氧在糖平面之下；而在 $\beta$ 构型中，则在上。（糖的性质和命名较为详细的讨论请见第12章。）胞壁多糖的全部糖苷键都具有 $\beta$ 构型（图7-3）。NAM和NAG顺序互相交替。因此，胞壁多糖是NAM和NAG残基通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键互相交替联接而成的高聚物。不同的多糖链之间是通过联在一些NAM残基上的短肽进行交联的。

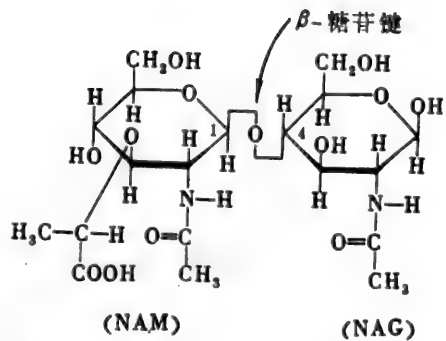


图7-3 NAM通过一个 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键与NAG相联。

溶菌酶水解NAM的C-1和NAG的C-4之间的糖苷键（图7-4）。NAG的C-1和NAM的C-4之间形成的另一种糖苷键，不被裂解。几丁质是在甲壳动物的壳中找到的一种多糖，也是溶菌酶的一个底物。几丁质只由NAG残基通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键连接而成。

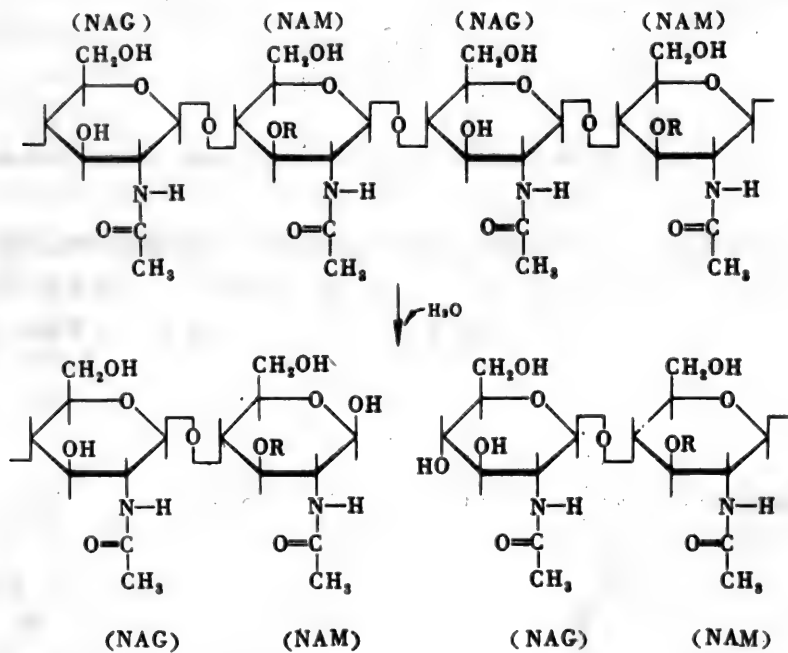


图7-4 溶菌酶水解NAM和NAG之间的糖苷键(R代表NAM的乳酰基)。

### 溶菌酶的三维结构

溶菌酶是一个较小的酶。这个得自来源丰富的鸡蛋白的酶是由129个氨基酸的单一多肽链组成的，分子量为14.6k dal。这个酶由四个二硫桥交联，使它取得高稳定性。溶菌酶的氨基

酸顺序示出于图7-5中。

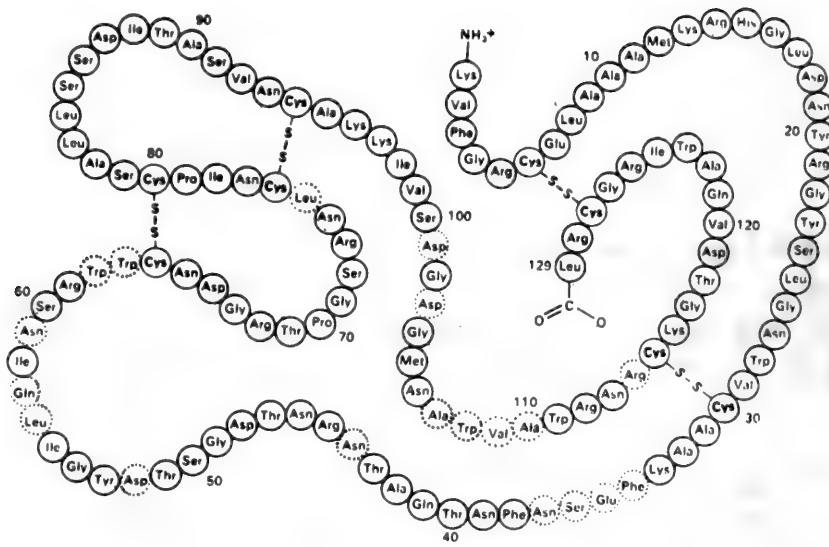


图7-5 鸡蛋白溶菌酶的氨基酸顺序。活性部位中那一部分残基用小点圈出。[依据R.E. Canfield and A.K.Liu./ *Biol. Chem.* 240(1965):2000; D.C.Phillips, *Sci. Amer.* (5) 215(1966): 79]

在1965年，菲利普斯 (David Phillips)和他的同事测定了溶菌酶的三维结构。他们的高分辨电子密度图是为一个酶分子给出的第一个这样的图。溶菌酶是一个紧密的分子，粗具椭球外形，大小为 $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ 。分子的折叠是复杂的(图7-7)。 $\alpha$ 螺旋要比在肌红蛋白和血红

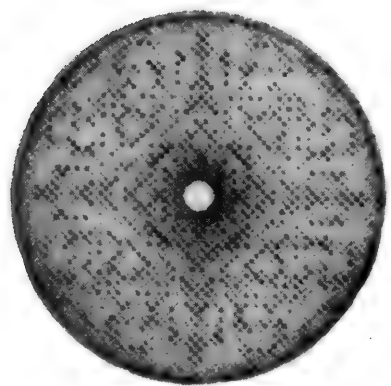


图7-6 溶菌酶晶体的x射线衍进照相。[蒙Dr. David Phillips特许。]

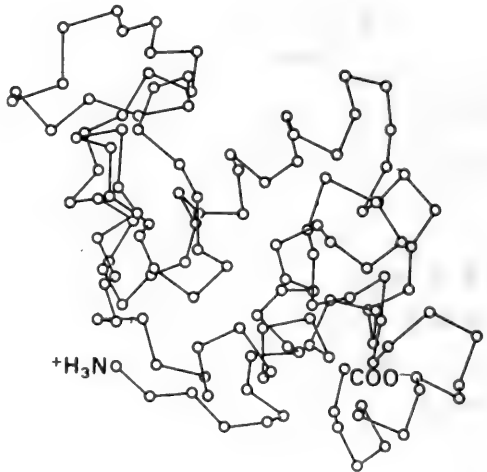


图7-7 溶菌酶的三维结构。只示出 $\alpha$  碳原子。[蒙Dr.David Phillips特许。]

蛋白中少得多。在几个区域中多肽链处在伸展的构象中。其中有一个这样的链对折回来，而且这两段多肽之间通过肽基形成氢键。这个发夹部分是与前面提到的规则地重复的二级结构，即丝蛋白中所见的反平行 $\beta$ 折叠结构相似的。正如肌红蛋白和血红蛋白中那样，溶菌酶内部几乎全是非极性的。疏水相互作用在溶菌酶的折叠中显然是很重要的，这一点与大多数蛋白中的情况没有什么不同。

### 寻找溶菌酶中的活性部位

关于溶菌酶的三维结构的详细知识并不能立即显示催化机制。实际上，活性部位的位置不是从电子密度图上就可以一目了然的。与肌红蛋白和血红蛋白这样的蛋白质不同，溶菌酶并不包含一个辅基，从而缺少一个能指明活性部位所在的内在路标。用来鉴别活性部位、规定底物结合方式以及阐明酶的机制所需的信息，来自对溶菌酶与其抑制剂相互作用的一个x射线晶体学研究。已知某一蛋白质的三维结构后，从x射线晶体学方法来测定小分子结合上去的方式，就往往比较容易办到。这样的实验之所以可行，是因为蛋白晶体相当疏松而能渗透。相当大的抑制剂分子可以扩散到不同蛋白分子间沟渠中，并投奔专一的结合部位。如果晶体结构没有显著改变的话，对应于新加入分子的电子密度，可以（应用已经为母体蛋白晶体测定的相角）从x射线衍射强度中直接计算出来。这种技术称为差值福里埃（**Fourier**）方法。

人们当然向往能用差值福里埃方法来揭示正在进行催化作用的酶-底物（ES）复合体的结构。但是，在通常条件下，结合上去的底物分子转化成产物，要比一个新的底物分子扩散进晶体快得多。有时可以这样来绕过这个困难：通过冷却晶体到低温（如 $-50^{\circ}\text{C}$ ）来减慢催化过程。这样的实验办法称为低温酶学。另外研究酶与它底物的无活性（或反应很慢）的类似物生成的复合体，也能引出不少信息。对溶菌酶来说，可用N-乙酰葡萄糖胺的三聚物（tri-NAG或NAG<sub>3</sub>），其结构示出于图7-8中。少于五个残基组成的N-乙酰葡萄糖胺中的寡聚物，水解如果不是进行得很慢，就是根本不进行。但它们都结合到酶的活性部位上。诚然，tri-NAG是溶菌酶有力的竞争性抑制剂。

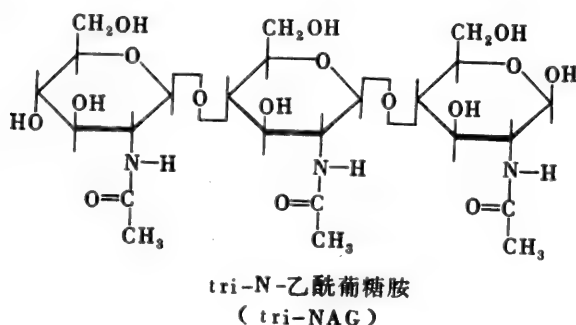


图7-8 三-N-乙酰葡萄糖胺（tri-NAG或NAG<sub>3</sub>），溶菌酶的一个竞争性抑制剂。

## 竞争性抑制剂结合的方式

Tri-NAG溶菌酶复合体的x射线研究指明了活性部位的位置,显示了决定底物专一结合的相互作用,并得以为酶提出一个具体的作用机制。Tri-NAG与溶菌酶结合在表面的一个沟中,并差不多占据了半个沟。Tri-NAG是通过氢键和范氏互作用与溶菌酶结合的。静电互作用不起作用,因为tri-NAG缺乏离子基因。

Tri-NAG与溶菌酶之间的氢键互作用示出于图7-9中。天冬氨酸101的羧酸基与残基A和B形成氢键。最专一而广泛的氢键形成于酶与糖残基C之间。总共形成了四个氢键。色氨酸62的吲哚环上的NH与C-6上的氧形成氢键。相邻的氨基酸残基,色氨酸63,也以类似的方式与C-3上的氧结成氢键。当tri-NAG结合到酶上后,色氨酸62的环移动 $0.75\text{\AA}$ 。糖残基C的乙酰氨基侧链上的CO和NH基分别与氨基酸残基59和107在主链上的NH和CO基形成很好的氢键。

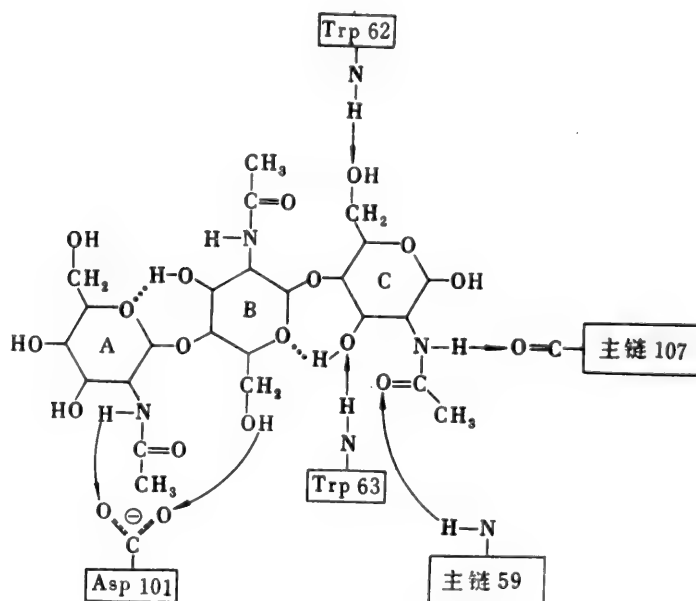


图7-9 Tri-NAG与溶菌酶之间的氢键。

Tri-NAG和酶之间的范氏接触是大量的。糖残基B并不怎样与酶产生极性接触,但与色氨酸62的吲哚环紧密缔合。残基A与溶菌酶的接触是相当单薄的。

## 从结构到酶的作用机制

1. 底物是怎样结合上去的?前面已经指出,起作用的底物的结合方式并不能直接通过x射线晶体学方法确立。但是,酶竞争性抑制剂复合体的结构可以为底物怎样与酶结合,提供关键性线索。找出tri NAG只充填在溶菌酶的半条沟中,曾是一个很有启发性的起点。曾



经设想，从tri-NAG作为一个抑制剂观察到的结合所涉及的相互作用也适用于底物的结合。看来很可能，需要更多的糖残基去填充另外半条沟，就会形成一个有反应活性的ES复合体。正好为三个另外的糖残基留着空间。这一点很令人振奋，因为已知N-乙酰葡萄糖胺的六聚物(hexa-NAG)能被酶水解得很迅速。

增添的三个糖残基，称为D，E和F，通过细心搭建模型，填入沟中（图7-10）。残基

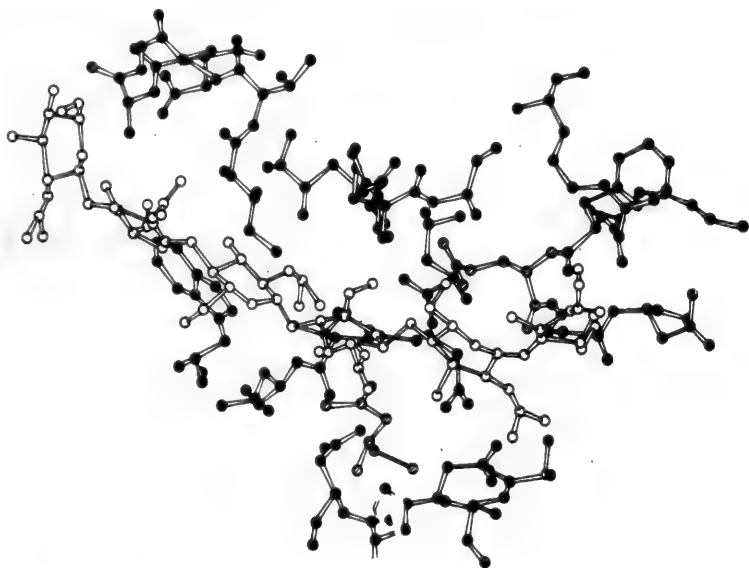


图7-10 六聚-NAG (无色)与溶菌酶结合的方式。糖残基A、B和C (左)的位置就是在tri-NAG-溶菌酶复合体中观察到的位置，而残基D、E和F(右)的位置是通过搭建模型引出的。两个以斜线球示出的残基直接参与催化作用。

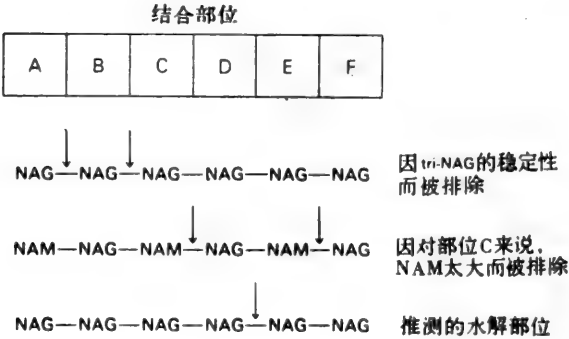
E和F进入得很相宜，形成了几个良好的氢键和范氏接触。但是，残基D并不适合，除非它有所畸变。它的C-6和O-6原子与酶上的若干基团太接近，除非其中的环从正常的椅型构象有所改变。

2. 哪个键被裂解？N-乙酰葡萄糖胺寡聚物的水解速度，当残基数从四增至五，这就是从NAG<sub>4</sub>到NAG<sub>5</sub>时，显著上升（表7-1）。当第六个残基（NAG<sub>6</sub>）加入后，裂解速度仍有所上升。但残基数再增到八时就没有变化了。这个发现是与晶体学结果相符的，后者指出，活性部位所在的沟正好被六个糖残基装满。

表7-1 N-乙酰葡萄糖胺寡聚物作为底物的效果

底物	水解的相对速度
NAG <sub>2</sub>	0
NAG <sub>3</sub>	1
NAG <sub>4</sub>	8
NAG <sub>5</sub>	4,000
NAG <sub>6</sub>	30,000
NAG <sub>8</sub>	30,000

那末, hexa-NAG 的哪个键被裂解了? 因为 tri-NAG 是稳定的, A—B 键(这是糖残基 A 和 B 之间的糖苷键)不可能是裂解的部位。同理, B—C 键也不是裂解的部位。第二个有决定性意义的证据是部位 C 不能为 NAM 占据。NAG 很适合部位 C, 而 NAM 由于其中的乳糖基就嫌太大了。细菌胞壁中被裂解的键为 NAM-NAG 键。因此, 若细菌胞壁多糖也按 hexa-NAG 的方式与酶结合的话, C—D 也不可能成为裂解的部位。而 NAM 不能适合到部位 C 中, 进一步排除了另一个裂解部位: E—F 键。胞壁多糖是一个 NAM 和 NAG 交替的高聚物, 从而 NAM 若不能占据部位 C 时也就不能占据部位 E。



这些观察排除了 A—B, B—C, C—D 和 E—F 键作为六聚底物酶解部位的可能性。因此, D—E 键是唯一不能排除的裂解部位 (图 7-11)。

3. 酶上哪些基团参与催化作用? 推测断裂的是 D—E 键, 是确定酶上哪些基团进行水解作用的重要步骤。但仍然需要把裂解部位规定得更精确

图 7-11 引出糖残基 D 和 E 之间的糖苷键为溶菌酶所裂解, 这个结论的步骤。

一些: 究竟键是在糖苷氧原子的哪一侧被裂解的? 回答这个问题可以在富集氧的稳定重同位素  $^{18}\text{O}$  的水中进行酶促水解 (图 7-12)。分离出来的糖含有接在 D 糖 C-1 上的  $^{18}\text{O}$ 。相反, 与 E 糖 C-4 相连的羟基含有氧的普通同位素。因此, 断裂的键是在残基 D 的 C-1 和与残基 E 形成糖苷键的氧之间。这个实验说明了应用同位素可以揭示酶的作用机制。没有同位素标记, 如果不是不可能, 至少也是难于确定裂解的精确部位的。

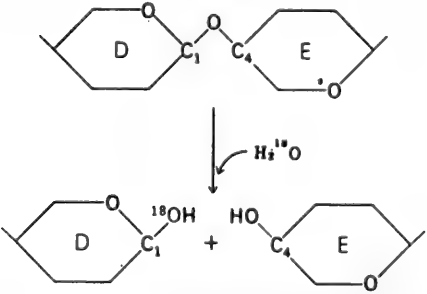


图 7-12 在  $^{18}\text{O}$  水中的水解指出, 溶菌酶裂解的是 C<sub>1</sub>—O 键, 而不是 O—C<sub>4</sub> 键。(这里只示出 D 和 E 残基的骨架。)

然后要在裂解的糖苷键附近搜索可能的催化基团了。正如前面一章中提到过的, 催化基团是直接参与共价键形成或断裂的基团。最可能的候选者是那些起着氢键供体或受体的基团。提供或抽走一个氢离子是在多数酶促反应中关键的一步。与溶菌酶所裂解的糖苷键邻接的残基只有天冬氨酸 52 和谷氨酸 35。天冬氨酸残基是在糖苷键的一侧, 而谷氨酸残基则在另一侧。这两个酸性侧链具有明显不同的环境。天冬氨酸 52 是在一个明显极性的环境中, 在那里它在一个复杂的氢键网络中起着氢键受体的作用。相反, 谷氨酸 35 位于非极性区。这样, 在 pH 5 下, 这是溶菌酶水解几丁质的最适 pH 值, 天冬氨酸

52 是在电离的  $\text{COO}^-$  形式中, 而谷氨酸 35 是在未电离的  $\text{COOH}$  形式中。每个这些酸性基团中最邻近的氧约与糖苷键相距 3 Å (图 7-13)。

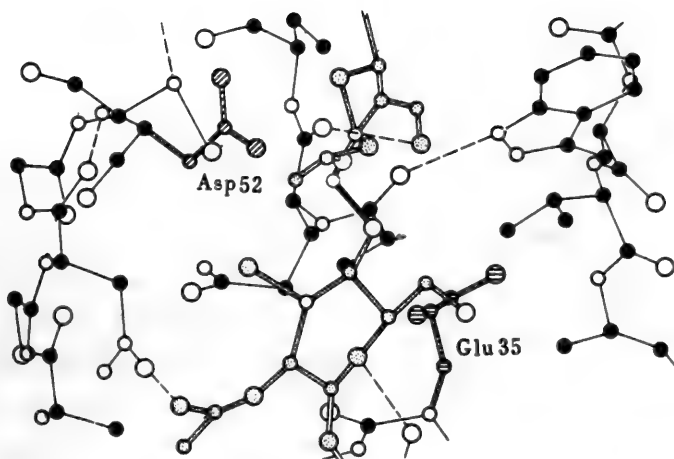


图7-13 溶菌酶活性部位的部分结构。Hexa-NAG底物的D和E环以密点球示出。天冬氨酸52和谷氨酸35的侧链就在邻近，并各以斜线球和横线球示出。[依据W.N.Lipscomb. *Proc.Robert A. Welch Found.Conf.Chem. Res.* 15(1971): 150]

## 正碳离子中间物对催化作用十分关键

菲利浦斯和他的同事们根据前面的结构资料为溶菌酶提出了一个详细的催化机制。重要的步骤为：

1. 谷氨酸35的—COOH基向D环的C-1和糖苷氧原子之间的键提供一个H<sup>+</sup>，并使这个键裂解（图7-14）。

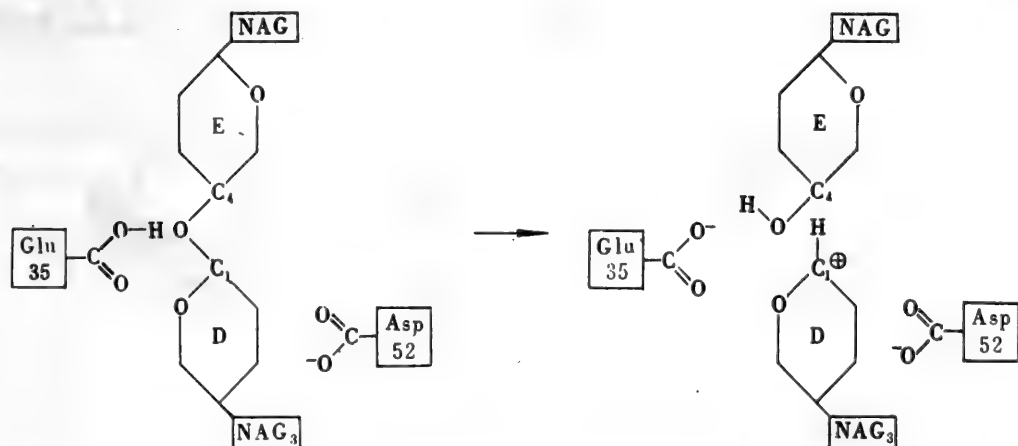


图7-14 为溶菌酶提出的催化机制的第一步是从谷氨酸35转移一个H<sup>+</sup>到糖苷键的氧原子。糖苷键从而被裂解，并形成一个正碳离子中间物。

2. 这样就会在D环的C-1上产生一个正电荷。这个短暂的物种称为正碳离子，因为它有一个荷正电的碳原子。

3. 由残基E和F组成的NAG二聚物通过扩散离开了酶。

4. 正碳离子中间物进一步与来自溶剂的 $\text{OH}^-$ 反应(图7-15)。由A, B, C和D组成的tetra-NAG, 通过扩散离开酶。

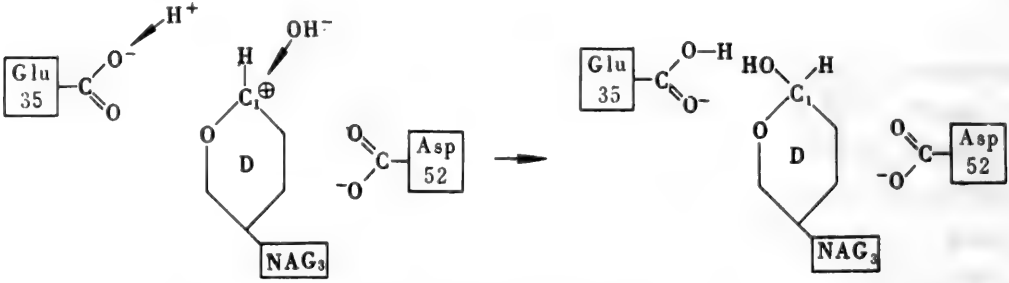


图7-15  $\text{OH}^-$ 和 $\text{H}^+$ 分别加合正碳离子中间物和Glu35的侧链后水解反应趋于完成。

5. 谷氨酸35重新取得质子，从而酶为新一轮催化过程作好了准备。

这个催化程式的关键要素为：

1. 普通的酸催化作用。一个质子从谷氨酸35转移出去，而后者为非电离的游离酸，并与糖苷氧原子相隔适中的距离 $3\text{\AA}$ 。

2. 促进正碳离子中间物形成的作用。酶促反应显著地受到两个使正碳离子中间物趋于稳定的不同因素所促进：

a. 与正碳离子中间物相距 $3\text{\AA}$ 之处存在着一个带负电的基团，是一个静电因素。天冬氨酸52在此为带负电的羧酸根，可与环D的C-1上的正电荷发生静电互作用。

b. 还有一个几何因素，就是环D的畸变(图7-16)。Hexa-NAG要最佳地适合到活性部

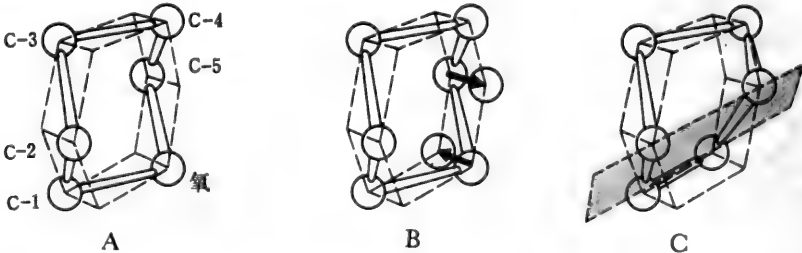


图7-16 溶菌酶底物的D环畸变成半椅型：(A)在正常椅型中的糖残基；(B)在与溶菌酶结合时，糖残基D的环氧原子和C-5移动到使C-1, C-2, C-5和O共面，如(C)中所示。[依据D.C. Phillips, The three-dimensional structure of an enzyme molecule, Copyright © 1966 by Scientific American, Inc.,]

位的沟中，糖残基D就需要从它通常的椅型构象畸变成半椅型。这个畸变可以增进催化作用，

因为半椅型几何特征可以显著地促进正碳离子的形成。半椅形式中碳原子1,2和5以及环氧原子的共面能使C-1和环氧原子分享正电荷。于是,在结合的过程中,酶迫使底物采纳过渡态的几何要求,而过渡态实为正碳离子。

## 实验支持提出的机制

根据晶体学研究提出的底物结合方式和催化作用机制,曾在各种化学实验中受到检验。所有实验结果到现在为止都能支持这个晶体学假设。在这点上有些实验得出的结果特别中肯。

1. 裂解模式。hexa-NAG断裂成tetra-NAG和di-NAG,肯定了晶体学所假设的裂解发生在六聚物的第四和第五残基之间(图7-17)。

2. 结合亲和力。六个糖残基中每一个对六聚体底物结合自由能总值的贡献,曾从结合平衡的测量中予以确定(图7-18)。所得令人瞩目的结果是糖残基D对结合亲和力作出了负的贡献。

结合残基D要支付约4kcal/mol。这个结果证实了晶体学认为残基D是在畸变形式中结合的。残基D从通常的椅型畸变为半椅型,当然要付

出代价。同样有意思的是,残基C对结合亲和力作出了最大的正贡献。晶体学模型指出,残基C形成很多氢键和范氏互作用。

3. 过渡状态类似物。糖残基D畸变成半椅型是假设的酶作用机制的一个重要方面,因为半椅型被假设为过渡状态的构象。正如上面指出的,这个想法在了解到结合残基D需要支付能量或付出畸变的代价后得到了支持。从研究底物的过渡状态类似物,又得到了进一步的

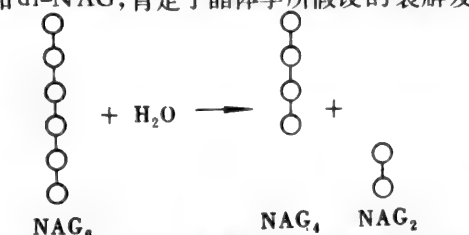


图7-17 hexa-NAG水解为tetra-NAG和di-NAG。

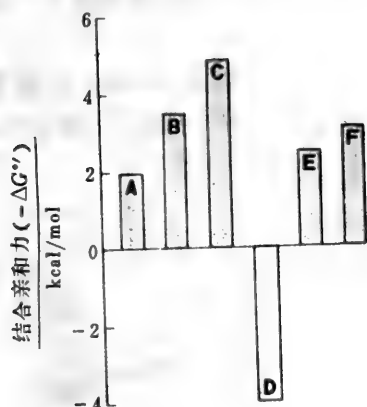
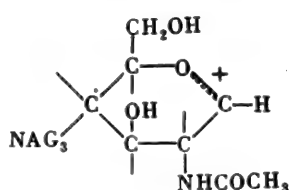


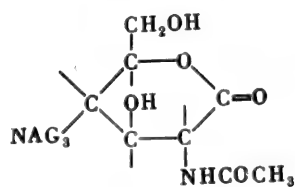
图7-18 hexa-NAG中每个糖对这个底物结合的标准自由能所作的贡献。

要为残基D的结合支付自由能,因为它需要通过畸变来配入活性部位中。

证据。过渡状态类似物是指一个在与酶结合前和结合上去后,都具有催化过程中过渡状态几何特征的化合物。tetra-NAG的内酯类似物D环(图7-19),在四糖本身的晶体中就已具有半



tetra-NAG的正碳离子衍生物



tetra-NAG的内酯类似物

图7-19 tetra-NAG的内酯类似物酷似溶菌酶催化反应中的过渡态中间物,因为D环具有象半椅型这样的构象。

椅构象。当与溶菌酶结合时,这个类似物D环的C-1, C-2, C-4, C-6和O原子是共面的。这个沙发式构象与为过渡状态所假设的半椅形式相似,从而这个内酯类似物与溶菌酶结合,并不需要经过畸变,这就与tetra-NAG很不一样了。实际上, tetra-NAG的这个内酯类似物结合到溶菌酶的A到D各个亚部位上,要比tetra-NAG本身强3600倍。这个结果建议, 正常底物D环的畸变可以按3600这样等级的因子加速催化作用。

催化作用中的这个因素早在1948年为鲍林 (Pauling) 在一次学术报告中所预见:

我想, 酶在结构上是与其所促反应的活化复合物互补的分子, 亦即与介于催化过程反应物和生成物之间的分子构型互补的分子。酶分子对活化复合物的吸引将使后者的能量降低, 从而使反应的活化能降低, 并导致反应速度的增加。

4. 催化速度对PH的依赖关系。几丁质的水解速度在PH 5下为最大(图7-20)。酶作用的活性在此最适PH的两侧都迅速下降。在碱侧下降的原因是由于谷氨酸35的电离, 而在酸侧水解速度下降反映了天冬氨酸根52的质子化。溶菌酶只在谷氨酸35非电离和天冬氨酸根52电离时才具有活性。

5. 选择性化学修饰。当溶菌酶中除谷氨酸35和天冬氨酸52以外的所有羧基都被酯化后, 仍能保留其活性。如果这个反应在底物存在下进行则谷氨酸35和天冬氨酸根52就不会被修饰。当底物移走后, 天冬氨酸根52也将被酯化 (而谷氨酸35仍保持不变)。修饰天冬氨酸根52后使酶完全丧失活性。这一事实能支持这样的论点: 天冬氨酸根52的羧酸根的精确位置, 是使正碳离子中间物趋于稳定的重要因素。

6. 转糖基作用。若将tetra-NAG加到溶菌酶上时, hexa-NAG和di-NAG会以缓慢的速度生成 (图7-21)。这个称为转糖基作用的反应支持了提出的酶作用机制的一个重要特点,

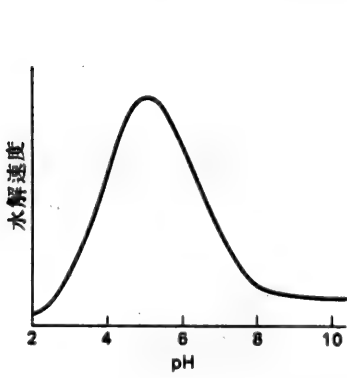


图7-20 溶菌酶水解几丁质 (poly NAG)的速度随pH递变的函数关系。

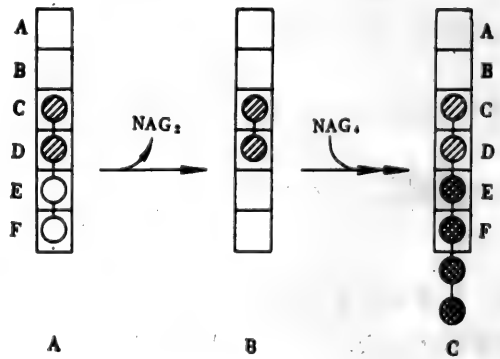


图7-21 生成了糖基-酶中间物这一点, 已为溶菌酶催化一个缓慢的转糖基反应这一事实所支持。NAG<sub>2</sub> (以网线示出)加到糖基-酶中间物 (在B中以斜线示出) 上给出NAG<sub>6</sub>。

即生成一个糖基-酶中间物。在通常的水解反应中, 这个糖基-酶中间物与OH<sup>-</sup>反应。在转糖基作用中, 是与另一个糖: R-OH进行了反应。转糖基反应是专一的, 因为受体是与活性部位沟中的部位E和F结合的。此外, 生成的糖苷键具有β构型, 与底物相同。这个结果也支持了为催化作用中间物提出的几何特征。

## 羧肽酶A：一个含锌的蛋白水解酶

现在我们转到羧肽酶A。这是一个水解多肽链中羧端肽键的消化酶。如果羧端残基有一个芳香族或臃肿的脂肪族侧链（图7-22），水解作用进行起来非常容易。这个酶的催化机制

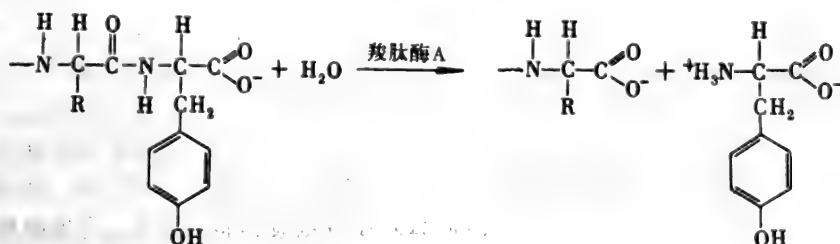


图7-22 羧肽酶A催化的反应。

特别有意思，因为它与溶菌酶的很不一样。即将讨论的羧肽酶A，其催化机制中有两个方面值得个别指出：

1. 诱导适合。底物的结合需要酶的结构有很大的变动。
2. 电子应变。酶在其活性部位上包含一个锌原子和其他基团，它们引起底物中的电子重新排布，从而使底物对水解更为敏感。

1967年利普斯科姆，W. (William Lipscomb) 以2Å分辨率解出了羧肽酶A的三维结构（图7-23）。这个酶是307个氨基酸形成的一个单一多肽链。羧肽酶A具有紧密的外形，大体



图7-23 羧肽酶A的三维结构。只示出α碳原子和锌离子（中心附近黑色的圆）。[引自W.N. Lipscomb, *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* 15 (1971): 134.]

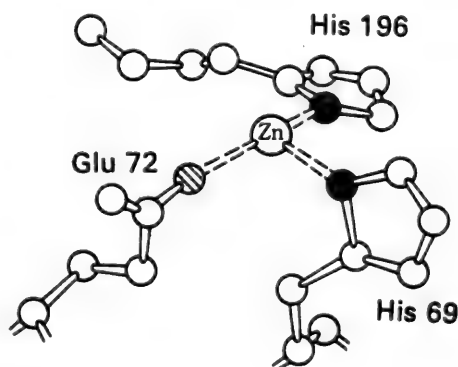
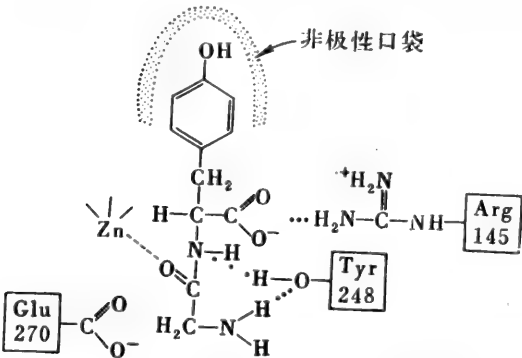


图7-24 锌离子在羧肽酶A的活性部位上与两个组氨酸侧链和一个谷氨酸侧链相配位。与锌配位的一个水分子没有示出。[依据D.M. Blow and T.A. Steitz, *x-ray diffraction studies of enzymes*, *Ann. Rev. Biochem.* 39: 78. Copyright © 1970 by Annual Reviews, Inc.]

上是一个  $50 \times 42 \times 38 \text{ \AA}$  的椭球体。其中含有  $\alpha$  螺旋 (38%) 和  $\beta$  折叠片 (17%) 等区域。还有一个结合得较紧的锌离子, 它对酶的活性很重要。锌离子位于分子表面附近的一个槽中, 它处在两个组氨酸侧链、一个谷氨酸侧链和一个水分子形成的四面体配位中 (图7-24)。锌离子附近的大口袋正好容纳肽底物末端残基的侧链。

### 底物的结合在羧肽酶A的活性部位上引起较大的结构变化

底物与羧肽酶A结合的方式已从甘氨酸酪氨酸与这个酶的复合物结构中引出。甘氨酸酪氨酸是一个水解缓慢的底物。它的结合 (图7-25和7-26), 可以通过五种相互作用来描述。



1. 甘氨酸酪氨酸带负电荷的末端羧酸根与精氨酸145带正电荷的侧链发生静电互作用。

2. 底物的酪氨酸侧链结合到酶的一个非极性口袋中去。

图7-25 甘氨酸酪氨酸结合到羧肽酶A活性部位上的示意图。这里示出了设想的催化活性复合物。

- 待裂解的肽键上NH的氢与酪氨酸248的芳香族侧链上OH基形成氢键。
- 待裂解的肽键上的羰基是与锌离子配位的。
- 底物的末端氨基通过一个介入的水分子与谷氨酸根270的侧链结成氢键。这个互作用可能在产率高的ES复合体中并不发生, 实际上它是甘氨酸酪氨酸水解缓慢的原因。

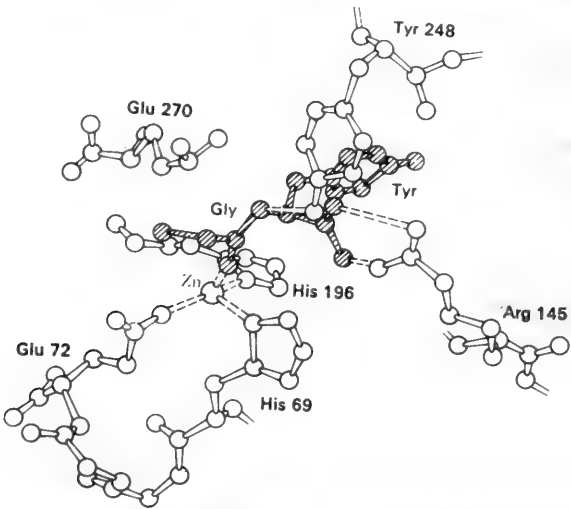


图7-26 甘氨酸酪氨酸在羧肽酶A活性部位上的三维结构。底物甘氨酸酪氨酸以斜线球示出。[依据D.M. Blow and T.A. Steitz, x-ray diffraction studies of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.* 39:79, Copyright © 1970 by Annual Reviews, Inc.]



甘氨酸酪氨酸的结合引起活性部位进行结构上的重新安排（图7-27）。实际上，酶的催化基团通过底物的结合将被放在正确的方位上，如同科什兰（Koshland）原来在酶作用的诱导-适合模型中提出的一样。正如谷氨酸根270的羧基那样，精氨酸145上的胍基移动了2Å。底物的羧基置换一个配位水分子结合到锌离子上。当底物的酪氨酸侧链与非极性口袋结合时，至少有另外四个水分子从其中被置换出来。最大的构象变化要算酪氨酸248的酚羟基移动12Å，大约相当于这个蛋白分子直径四分之一的一个距离。这个移动主要是通过一个绕碳-碳单键进行起来很方便的转动来实现的。酪氨酸248的羟基从分子表面移到底物

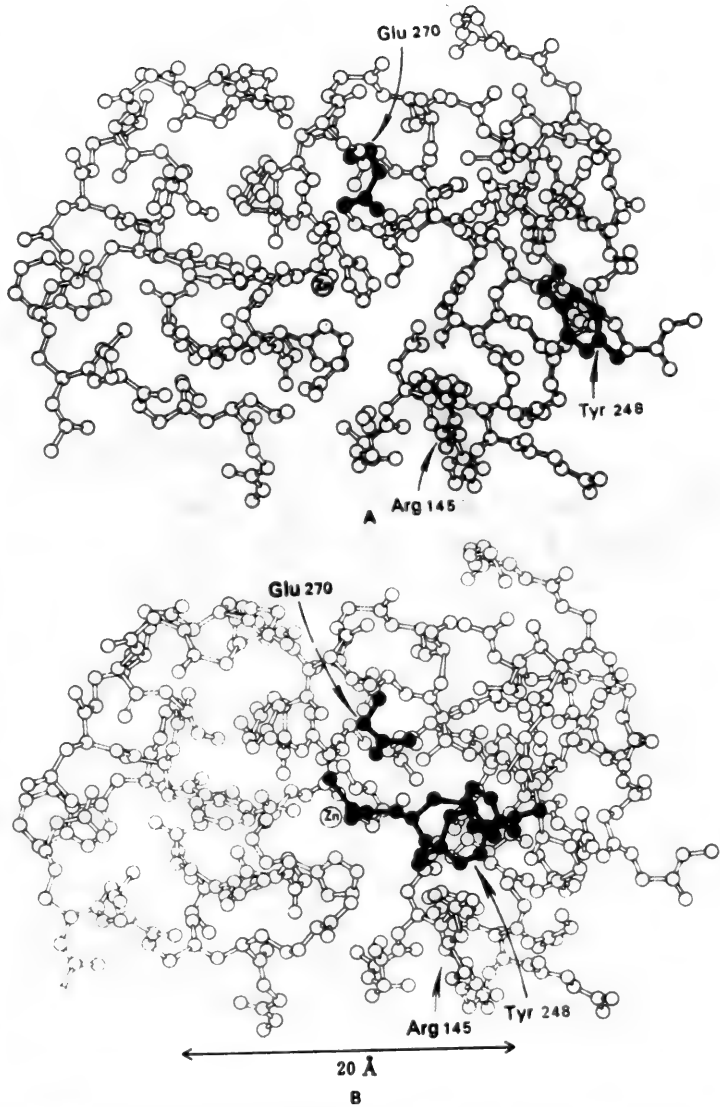


图7-27 羧肽酶 A 的结构在结合底物后发生变化：（A）酶单独存在时；（B）酶，底物复合体（底物甘氨酸酪氨酸以深灰色示出）。这里只示出酶的一部分。  
[依据 W. N. Lipscomb, *proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* 15 (1971) : 140—141.]

的肽键附近。这个移动的一个重要后果是把活性部位的空腔关闭了，并完成了使这个空腔从由水充填的区域成为疏水区域的转化。这些结构变化可能是通过精氨酸145结合到底物的末端羧基上来发动的。

### 电子应变加速了羧肽酶 A 进行的催化作用

利普斯科姆（Lipscomb）根据x射线晶体学研究为羧肽酶 A 提出了一个催化作用机制。假设有生产能力的 ES 复合体具有图7-28中的结构。在这个假设的机制中，酪氨酸248的羟基向待裂解肽键上的 N H 提供一个质子。这个肽键的羰基碳原子被谷氨酸根270中作为亲核基的羧

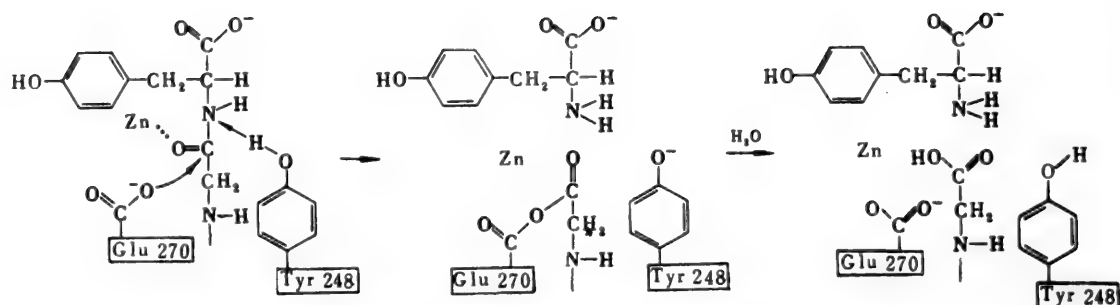


图7-28 为羧肽酶A提出的催化机制，其中，Glu直接攻击敏感肽键的羰基碳原子，而Tyr248则为这个肽键的NH基提供一个质子。所得的酸酐随着被水解。

酸基所进攻。所得谷氨酸270和底物的酸组分的酐将在下一步进行水解。

图7-29中示出另外一个机制，它也能与x射线数据符合。在这个程式中谷氨酸根270活化一个水分子。所得OH<sup>-</sup>直接进攻那个敏感肽键上羰基碳原子。同时，酪氨酸248提供一个质

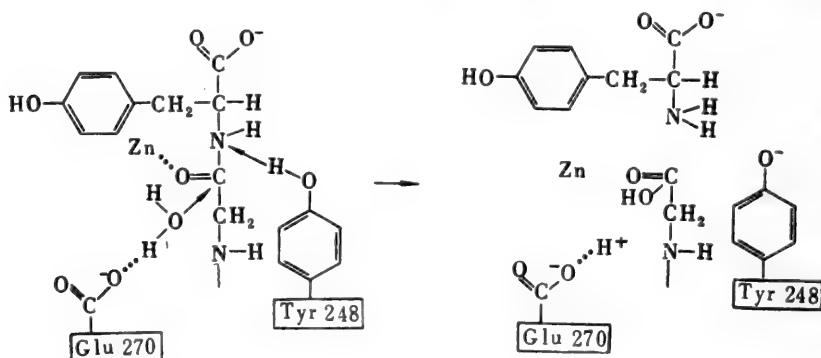


图7-29 羧肽酶A的另外一种催化作用机制。Tyr248的作用与图7-28中是一样的。但Glu270活化了水分子，后者进攻敏感肽键上的羰基碳原子。直接进行水解，没有形成酐。

子给敏感肽键上的NH基，并导致水解。这个机制不同于图7-28中者在于直接受水解的是底物的敏感肽键，而不是酸酐中间物。最近的化学和光谱研究表明，肽底物是通过这个直接机制水解的，而酯底物是先与谷氨酸根270形成酐，然后再水解的。

那末，锌在这个催化程式中的作用是什么？敏感肽键的羰基指向锌离子，致使C=O键被极化得比平常要多，这就使羰基碳原子更易受到亲核进攻。锌离子的非极性环境增进了偶极子的诱导作用，并使它的有效电荷增加。谷氨酸根270上负电荷在邻近也对羰基中诱导出一个较大的偶极子作出了贡献。这样，羧肽酶A在其底物中诱导电子应变来加速催化作用。

现在可以懂得为什么在羧肽酶A的活性部位中需要底物诱导出一系列结构变化了。结合进去的底物在每一侧都被酶的催化基团所包围。这种安排促进了催化作用，理由已在上面陈述。很明显，除非酶有机动性，底物根本进不了催化基团的阵列，而且产物也不能离开。一般说来，一个机动的酶与一个僵硬的酶相比，前者所拥有可供开发的催化作用和选择的进化进程的潜在构象就要多得多了。此外，诱导适合会对酶的专一性作出贡献。羧肽酶A的底物

应拥有一个末端羧基。酶按下面的方式检测这个基团。若它存在时，末端羧基就与精氨酸145生成盐键，后者触发酪氨酸248进入催化活性位置。如果没有末端羧基，这个动作就不会发生，而酶就不表现出活性。换言之，诱导适合可以起着动态识别过程的作用。

## 概 要

溶菌酶是一个裂解细菌细胞壁多糖组分的小酶。这个多糖是一个由N-乙酰葡糖胺(NAG)和N-乙酰胞壁酸(NAM)残基通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键交替组成的聚合物。溶菌酶水解NAM的C-1和NAG的C-4之间的糖苷键。N-乙酰葡糖胺的寡聚物也可被溶菌酶水解。Hexa-NAG和更高的寡聚物是很好的底物，而tri-NAG和di-NAG水解速度很慢。Tri-NAG是一个有效的竞争性抑制剂。溶菌酶和tri-NAG-溶菌酶复合体的三维结构知识都已达到足以分辨原子的水平。Tri-NAG占据半条横过酶分子的沟，并通过不少氢键和范氏互作用与酶相结合。Hexa-NAG是一个很好的底物，它的结合方式是从搭建模型中得出的，而搭建模型的起点为tri-NAG复合体的结构。

已为溶菌酶提出了一个可能的催化作用机制。第一，催化作用中关键性的基团为谷氨酸35的游离羧基和天冬氨酸根52的羧酸根离子。它们都与被水解的糖苷键，即六聚底物中残基D和E之间的糖苷键，相距约 $3\text{\AA}$ 。其次，谷氨酸35供一个 $\text{H}^+$ 给D环上C-1和糖苷氧原子之间的键，并使这个键裂解。D环上的C-1就荷正电；这个短暂的物种称为正碳离子。第三，这个正碳离子与来自溶剂的 $\text{OH}^-$ 反应，而谷氨酸根35同时也取得了一个质子。产物扩散出去以后，溶菌酶又准备进行新一轮催化反应了。第四，催化作用明显地被两个促进正碳离子中间物形成的因素所增强。静电因素是天冬氨酸根52带负电的侧链就在邻近。几何因素是环D畸变成半椅型，它能使正碳离子的正电荷为C-1和环上的氧原子所分享。

羧肽酶A作为一个水解多肽中羧基末端肽键的消化酶，例示说明了催化作用的一些不同的原理。这个酶以及它与一个底物类似物甘氨酸酪氨酸形成的复合体的结构知识也已达到分辨原子的水平。甘氨酸酪氨酸的结合在活性部位诱导出很大的结构变化，并使活性部位从被水填充的区域转化为一个疏水区。羧肽酶A例示说明了诱导适合在催化中所起的作用。这个酶的另一值得指出的特征是在其活性部位上含有对这个催化作用必不可少的锌离子。敏感肽键的羰基为锌所极化，致使它更易接受亲核进攻。这是在底物中诱导出电子应变的一个实例。在羧肽酶A进行的催化作用中，谷氨酸根270活化了一个水分子去直接向敏感肽键的羰基进攻。与此同时，酪氨酸248供给这个肽键的NH基一个质子，并使其水解。

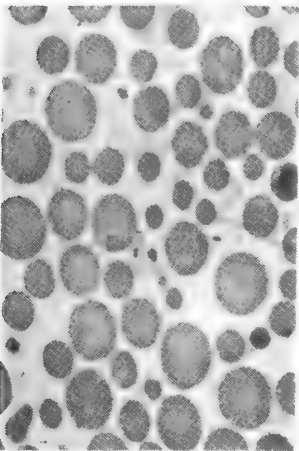
## 习 题

1. 推测下列寡聚糖被溶菌酶水解的相对速度(G代表一个N-乙酰葡糖胺残基，而M为N-乙酰胞壁酸残基)：
  - (a) M-M-M-M-M-M
  - (b) G-M-G-M-G-M
  - (c) M-G-M-G-M-G
2. 根据图7-18中给出的数据推测，溶菌酶上糖结合部位A到F中哪些将在主要的复合体中为下列各寡聚糖所占据(缩写符号同习题1)：

- (a) G-G
  - (b) G-M
  - (c) G-G-G-G
3. 假设在合成 hexa-NAG 时 D 和 E 糖残基之间的糖苷氧已为  $^{18}\text{O}$  所标记。溶菌酶水解中这个同位素将在哪个产物中出现?
  4. Tetra-NAG 中在残基 D 的 C5 上以一 H 置换  $-\text{CH}_2\text{OH}$  后可以得出一个类似物,它与溶菌酶结合得要比 tetra-NAG 强得多。请为结合亲和力的这个差别提出一个结构依据。
  5. 请将羧肽酶 A 中的 Zn 原子与氧合肌红和氧合血红蛋白中铁原子对比配位情况。
    - (a) 哪些原子直接与这些金属离子结合?
    - (b) 哪些侧链提供这些结合金属的基团?
    - (c) 蛋白质中还有哪些侧链是潜在的结合金属的基团?
  6. 关于羧肽酶 A 水解肽的直接机制 (图 7-29) 的实验证据来自氧-18 交换的研究。用  $^{18}\text{O}$  标记了羧基的 N-苯甲酰甘氨酸与羧肽酶 A 一起保温。在有 L-苯丙氨酸时,  $^{18}\text{O}$  被转移给  $\text{H}_2\text{O}$ 。相反,当加到保温混合物中去的是 L- $\beta$ -苯乳酸,而不是 L-苯丙氨酸时,没有  $^{18}\text{O}$  的转移。如何对这个结果进行最扼要的解释?

# 第 8 章 酶原活化：消化酶和凝块因子

随着自发地折叠成独特的三维形式，溶菌酶获得了全部酶活性。与此形成对比，很多其他蛋白质则先合成没有活性的前体，然后通过裂解一个或几个特定的肽键来予以活化。如果有活性的蛋白质是一个酶的话，那个没有活性的前体称为酶原（zymogen 或 proenzyme）。



通过专一性的蛋白水解作用来活化蛋白质，在生物体中是经常发生的。下面给出几个实例。

1. 使蛋白质水解的消化酶，在胃和胰脏中是作为酶原被合成的。（表8-1）

图8-1 胰脏的腺泡细胞中酶原粒的电子显微照片。[蒙Dr.G George Palade 特许。]

表8-1 胃和胰脏的酶原

合 成 部 位	酶 原	有 活 性 的 酶
胃	胃蛋白酶原	胃蛋白酶
胰脏	糜蛋白酶原	糜蛋白酶
胰脏	胰蛋白酶原	胰蛋白酶
胰脏	羧肽酶原	羧肽酶
胰脏	弹性蛋白酶原	弹性蛋白酶

2. 血液凝块是以一连串蛋白水解活化为媒介来进行的，它们保证了对创伤提供迅速而放大的反应。

3. 有些蛋白激素也是先作为无活性的前体被合成的。例如胰岛素是从胰岛素原通过蛋白水解除去一段肽以后引出的。

4. 存在于皮肤和骨骼中的胶原，是从一种可溶性前体原胶原中引出的纤维蛋白。

## 糜蛋白酶原通过特定的单一肽键的裂解而被活化

糜蛋白酶是一个消化酶，它在小肠中水解蛋白质。它的无活性前体糜蛋白酶原是在胰脏中合成的，正如其他几个酶原和消化酶一样。胰脏确实是合成蛋白方面最活跃的器官之一。酶和酶原是在胰脏的腺泡细胞中合成的（图8-2）。蛋白质从内质网移动被由脂类和蛋白质组成的膜所覆盖的高尔基器。这些酶原粒在电子显微镜中表现为很密的物体，因为它们具有高浓度的蛋白质（见图8-1）。酶原粒积聚在腺泡细胞的顶端，通过一个激素或神经冲动信号刺

激就会分泌到一个引向十二指肠的导管中

糜蛋白酶原是一个由245个氨基酸残基组成的单一多肽链。它是通过5个二硫键交联起来的。糜蛋白酶原几乎是没有酶活性的。当连接精氨酸15和异亮氨酸16的肽键被胰蛋白酶裂解后，它就会被转化成为活性完全的酶（图8-3）。得出的活性酶称为 $\pi$ -糜蛋白酶，然后与其他 $\pi$ -糜蛋白酶分子互相作用，切除两条肽后就得出这种酶的稳定形式 $\alpha$ -糜蛋白酶。在将 $\pi$ -转化为 $\alpha$ -糜蛋白酶时进行的裂解是多余的，因为 $\pi$ -糜蛋白酶已经具有完全的活性。这个活化过程引人注目的特点是，裂解特定的单一肽键使一个没有催化活性的蛋白转化成具有完全活性的形式。

图8-2 胰脏的腺泡细胞分泌酶原的示意图。[蒙Dr. George Palade 特许。]

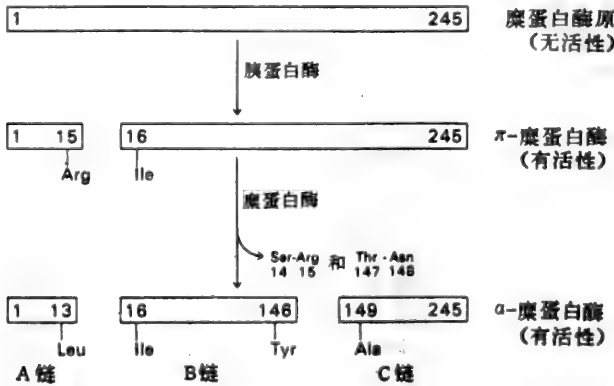
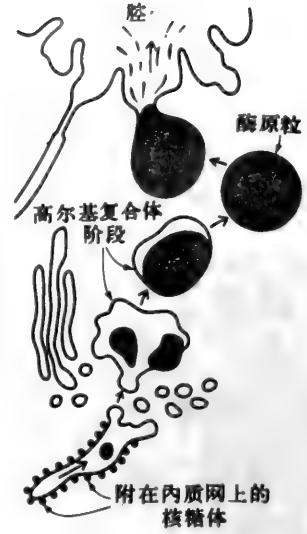


图8-3 糜蛋白酶原的活化过程。

### 糜蛋白酶的三维结构

理解这个值得注意的活化过程有赖于进一步了解糜蛋白酶的结构和催化作用机制。很幸运，已从化学和x射线晶体学研究中知道了这个酶的很多情况。实际上，糜蛋白酶是所有的酶中研究得最为透彻的一个酶，因而对它谈得仔细一些是有益的。

糜蛋白酶中有三条多肽链。它们通过两个链间的二硫键联接在一起（图8-4）。酶的分子

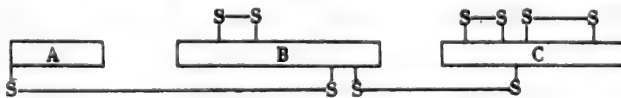


图8-4  $\alpha$ -糜蛋白酶含有两个链间二硫键和三个链内二硫键

量约为25kda1。布洛，D. (David Blow) 和他的同事们利用x射线晶体学研究，在2Å 分辨率的水平上得出了这个酶的三维结构(图8-5)。此分子是一个紧密的椭球体，大小为51 × 40

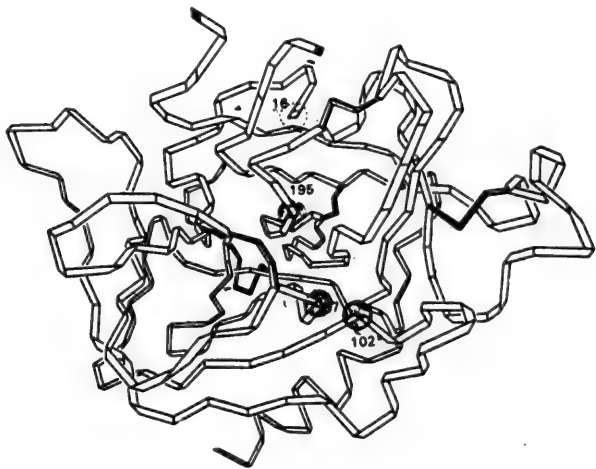


图8-5 α 糜蛋白酶的三维结构。只示出α 碳原子。在催化中起重要作用的残基用圆标出。[引自D.M.Blow, In *The Enzymes*, P.D. Boyer, ed., 3rd ed., vol. 3 (Academic Press, 1971), p.194.]

× 40Å。除了三个在催化中起关键作用的基团外，所有带电的基团都在分子的表面上。分子的折叠是复杂的。糜蛋白酶中α 螺旋极少，这一点与肌红蛋白和血红蛋白很不一样。多肽链倾向于完全伸展，而且走向往往是平行的，相隔约5Å。氢键广泛地形成于相邻两个肽段的基团之间。分子中有几处都有一种二级结构，很象溶菌酶中出现的反平行折叠片。

### 糜蛋白酶对芳香族和大块的非极性侧链的专一性

糜蛋白酶的生物学作用是在小肠中催化蛋白质的水解（图8-6）。这个反应的平衡几乎完

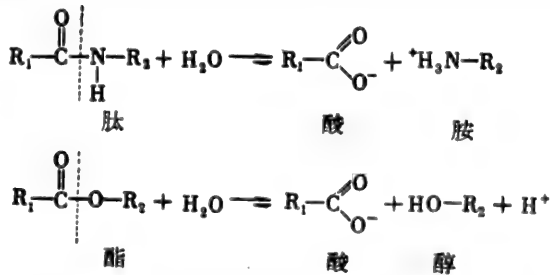


图8-6 糜蛋白酶催化肽键和酯键的水解。

全倒向水解（99%）。糜蛋白酶并不都以显著的速度裂解各种肽键。而它的专一性表现在

这样两类肽键上：在羧侧具有芳香族侧链的酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸以及象甲硫氨酸这样大块的疏水性残基的肽键（图8-7）。

糜蛋白酶也裂解酯键。虽然这个反应在生理上并不重要，但由于它与肽键水解的密切关系还是很有意义的（图8-6）。诚然，糜蛋白酶催化机制的知识，很多来自简单酯类水解的研究工作。

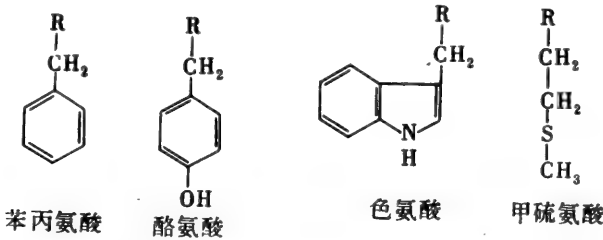


图8-7 糜蛋白酶优先水解那些在羧侧具有芳香族和大块的非极性侧链的肽键。

### 部分底物在催化过程中共价结合到糜蛋白酶上

糜蛋白酶催化肽键或酯键的水解，可分成两个不同的阶段。这在研究 *p*-硝基苯乙酸酯水解动力学时就看到了。当应用大量酶时，很明显分两个阶段释放产物之一的 *p*-硝基苯酚（图8-8）。开始以勃发态速度生成 *p*-硝基苯酚，随后放慢到一个平稳态速度。

第一步是 *p*-硝基苯乙酸酯与糜蛋白酶结合后形成一个酶-底物（ES）复合体（图8-9）。这个底物的

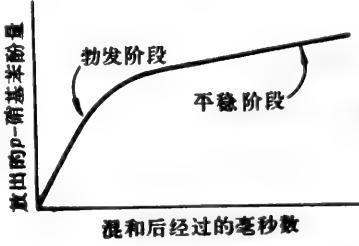


图8-8 混合糜蛋白酶和 *p*-硝基苯乙酸酯后，*p*-硝基苯酚的生成明显分成两个阶段。

酯键被裂解。然后产物之一的 *p*-硝基苯酚从酶上释放下来，而底物的乙酰基就以共价键与酶结合。水随着向乙酰-酶复合体进攻，给出乙酸根离子，并使酶再生（图8-10）。 *p*-硝基苯酚开

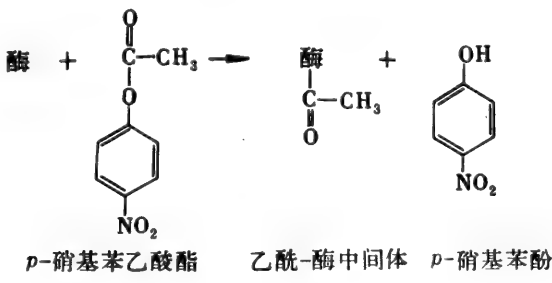


图8-9 酰化作用：生成乙酰-酶中间体。



始生成时的迅速勃发阶段相当于乙酰-酶复合体的形成。这一步称为酰化作用。在慢的平稳态中生成p-硝基苯酚，相当于乙酰-酶复合体通过水解再生游离的酶。这个第二步称为脱酰作用，

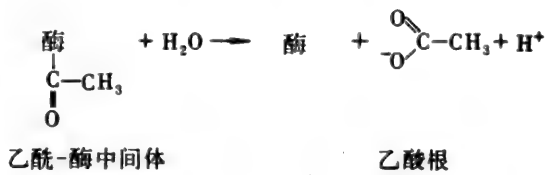


图8-10 脱酰作用：乙酰-酶中间体的水解。

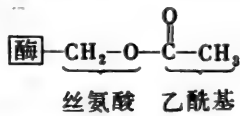
是在糜蛋白酶水解酯时限制速度的一步。实际上，乙酰-酶复合体是足够稳定的，从而在适当条件下是可以被分离出来的。糜蛋白酶的催化机制因此能表达为下列程式，其中P<sub>1</sub>为底物的胺（或醇）组分，E - P<sub>2</sub>是共价中间体，而P<sub>2</sub>是底物的酸组分。



这个机制与众不同的特色在于出现一个共价中间体。在上面讨论的反应中，一个乙酰基通过共价键结合到酶上去了。一般来说，在E - P<sub>2</sub>阶段与糜蛋白酶结合的基团是酰基。因此，E - P<sub>2</sub>是一个酰基-酶中间体。

### 酰基与酶上一个特别活泼的丝氨酸残基连接起来

酰基连接的部位是在把E - P<sub>2</sub>分离出来以后才鉴定出来的。这个中间体在pH 3下是相当



稳定的。酰基是与一个特定的丝氨酸残基，即丝氨酸195的氧原子相联的。这个丝氨酸残基特别活泼。它可以专一地用有机氟磷酸酯，如二异丙基氟磷酸酯（DIPF）来标记。DIPF只与丝

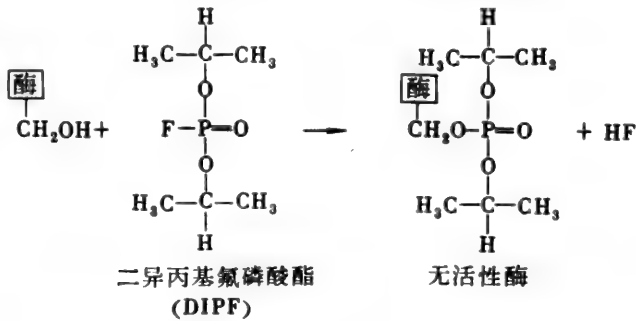


图8-11 二异丙基氟磷酸酯(DIPF)与丝氨酸195生成二异丙基磷酸酯衍生物后使糜蛋白酶失去活性。

氨酸195反应，生成一个无活性的二异丙基磷酰-酶复合体，后者是无限稳定的（图8-11）。丝氨酸195出众的反应活性可以通过下列事实窥见：糜蛋白酶中其他27个丝氨酸残基未受DIPF影响。

糜蛋白酶不是唯一能被DIPF失活的酶。不少其他蛋白水解酶，如胰蛋白酶，弹性蛋白酶，凝血酶和枯草杆菌蛋白酶，都能专一地与DIPF反应，并从而失去活性。反应也发生在那个唯一的丝氨酸残基上，正如在糜蛋白酶中那样。因此，这些酶称为丝氨酸蛋白酶。DIPF也与乙酰胆碱酯酶的丝氨酸残基反应，这个酶是在某些突触处传递神经冲动的关键。实际上，正如在第6章中提到过的那样，通过DIPF使乙酰胆碱酯酶失活是前者在杀虫剂和神经毒气上应用的根据。

### 通过亲和标记论证组氨酸57的催化作用

第二残基在催化中的重要作用已通过亲和标记研究予以明确。办法是使糜蛋白酶与一种分子反应，这种分子首先，（1）专一地结合到活性部位上，因为它很象一个底物；然后（2），与附近也在这个酶上的一个基团形成稳定的共价键。甲苯磺酰-L-苯丙氨酸氯甲基酮（TPCK）可以满足这些要求，它的结构示出于图8-12中。TPCK的苯丙氨酰侧链使它专一地

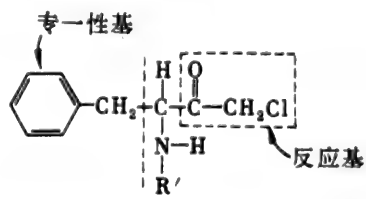


图8-12 糜蛋白酶的亲和标记试剂，甲苯磺酰-L-苯丙氨酸氯甲基酮（TPCK）的结构（R'代表甲苯磺酰基）。

与糜蛋白酶结合。TPCK中的反应基团是氯甲基酮功能团。TPCK对糜蛋白酶的进攻只及于组氨酸57，并使后者在其环上的氮原子烷基化（图8-13）。糜蛋白酶的TPCK衍生物并无酶的活

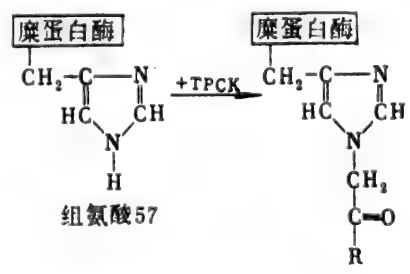


图8-13 在糜蛋白酶中组氨酸57通过TPCK进行烷基化。

性。组氨酸57属于活性部位的结论，受到三方面证据的支持。第一，亲和性标记反应具有高度的空间专一性；TPCK的D-异构体完全没有活性。其次，当糜蛋白酶的竞争性抑制剂β-苯丙氨酸存在时，反应会受到抑制。第三，通过TPCK使糜蛋白酶失活的速度随pH变化的方式几乎

与催化速度变化的方式相同

## 电荷接力网络在催化中起着穿梭运输质子的作用

糜蛋白酶的催化活性依赖于丝氨酸195的异常反应活性。在生理条件下， $-CH_2OH$ 基一般是相当不活跃的。究竟什么使它在糜蛋白酶的活性部位中这样活泼呢？从这个酶的三维结构的x射线研究中得出了一个可能的解释。正如从亲和性标记工作中可以预料到的，组氨酸57确与丝氨酸195相邻接。天冬氨酸102的羧基侧链也在其附近（图8-14）。

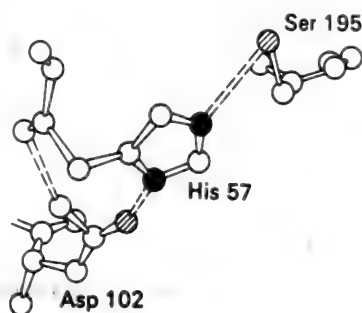


图8-14 糜蛋白酶中电荷接力体系的构象。[依据D. M. Blow and T. A. Steitz, x-ray diffraction studies of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.* 39 (1970): 86. Copyright © 1970 by Annual Reviews Inc.]

实际上，这三个残基相互作用以增强糜蛋白酶的催化能力。天冬氨酸102与组氨酸57生成氢键，而后者又与丝氨酸195生成氢键。这三个残基形成一个电荷接力网络。正如在126页上描述的那样，这个网络通过与一个质子短暂结合而在催化中起着关键作用（图8-15）。天冬氨酸102隐藏的羧酸根能使组氨酸57的咪唑基极化，并使其穿梭运输质子的能力增强。在丝氨酸的氧对底物进行亲核进攻时，天冬氨酸102和组氨酸57准备了从丝氨酸195的羟基接受质子。

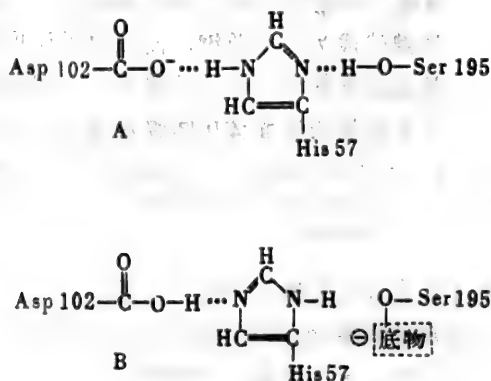


图8-15 糜蛋白酶中电荷接力网络：(A)酶本身；(B)加上底物后，天冬氨酸102和组氨酸57短暂地结合一个质子

## 糜蛋白酶包含一个能结合芳香族侧链的深口袋

糜蛋白酶与底物类似物复合体的晶体学研究已指明了专一性部位的位置以及一个好底物

的敏感肽键的可能取向。甲酰-L-色氨酸与糜蛋白酶结合，将它的吲哚侧链正好装进丝氨酸195附近的口袋中（图8-16）。这个较深的沟足以说明糜蛋白酶对芳香族和其他大块的疏水性侧

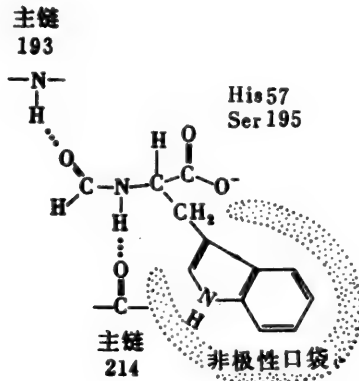
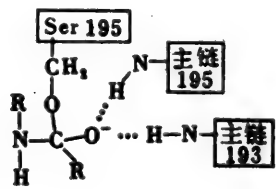


图8-16 底物类似物甲酰-L-色氨酸与糜蛋白酶结合情况的示意图。

链的专一性。糜蛋白酶与多肽底物类似物复合体的晶体结构分析指出了底物主链和酶的主链之间形成的广泛的氢键。氢键的模式与反平行 $\beta$ 折叠片中的相似。

### 催化作用形成的短暂四面体中间物

从广泛的x射线晶体学和化学数据中已经引出了糜蛋白酶的可能催化机制。在这个机制中，**组氨酸57和丝氨酸195**直接参与裂解底物的那个敏感肽键。肽键水解是从丝氨酸195上羟基



氧原子向敏感肽键上羰基碳原子的进攻开始的。这个羰基碳-氧键就成为一个单键，而氧原子还取得一分净负电荷。与羰基碳结合的四个原子安排成一个四面体。从共面酰胺基形成这个短暂的四面体中间物是通过带负电的羧基氧原子（称为

图8-17 糜蛋白酶的酰化作用和脱酰作用中的四面体过渡态中间物。来自酶主链的两个NH基形成的氢键对稳定这个中间物是很关键的：这个部位称为氧负离子穴。

一个氧负离子）和两个主链NH基之间的氢键促成的。（图8-17）。在形成这个四面体中间物时，另一个重要事件是一个质子从丝氨酸195转移到组氨酸57（图8-18）。这个质子的转移由于存在电荷接力网络而变得非常方便。天冬氨酸102精确地转向组氨酸57的咪唑环，并部分地中和了这个环上在过渡态中发展起来的电荷。然后，将这个网络中通过组氨酸-天冬氨酸偶联所贮存的质子供给敏感肽键的氧原子。结果是敏感肽键被裂解。在这个阶段，底物的胺组分与组氨酸57形成氢键，而底物的酸组分则与丝氨酸195酯化。现在水解反应的酰化阶段已经完成。

下一个阶段是脱酰作用（图8-19）。底物胺组分扩散离开后，一个水分子在活性部位取而代之。在实质上，脱酰作用是酰化作用的逆过程，而以 $H_2O$ 取代胺组分。首先，电荷接力网络从水抽走一个质子。所得OH<sup>-</sup>离子同时向与丝氨酸195连接的酰基上的羰基碳原子进攻。

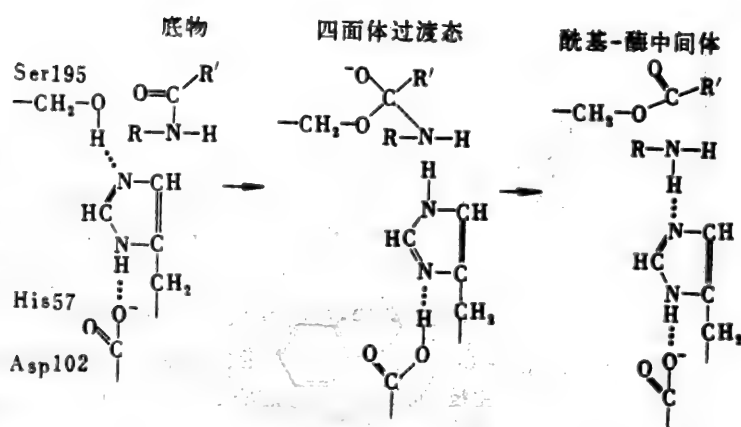


图8-18 糜蛋白酶水解肽的第一个阶段即酰化作用，形成了一个四面体过渡态。然后胺组分很快通过扩散离开，留下一个酰基-酶中间体。

正如在酰化作用中那样，形成了一个短暂的四面体中间物。然后，组氨酸57向丝氨酸195的氧原子供给一个质子，从而放出底物的酸组分。这个酸组分通过扩散离开，而酶就准备着进行另一轮催化作用了。

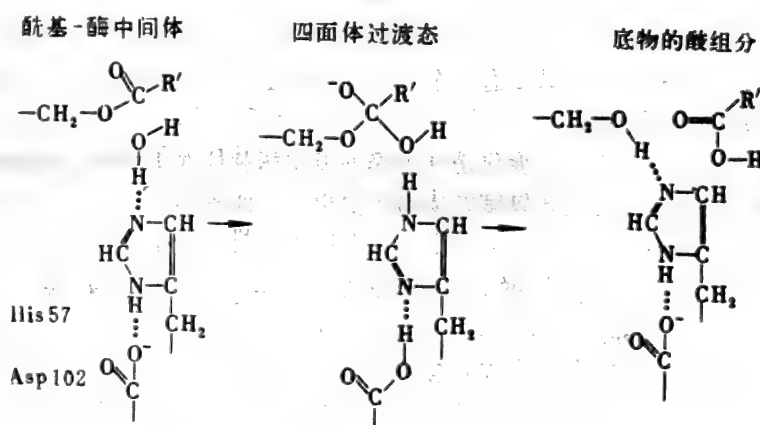


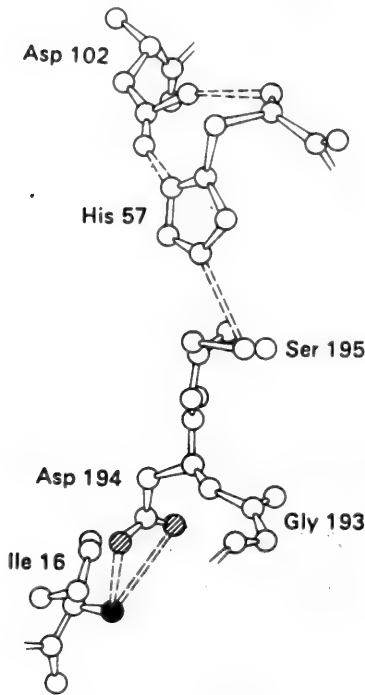
图8-19 糜蛋白酶水解肽的第二个阶段：脱酰作用。酰基-酶中间体被水所水解。注意，脱酰作用实际上是酰化作用的逆过程，以水取代底物的胺组分。

## 酶原活化的机制

现在我们讨论一下裂解糜蛋白酶原中一个单一肽键如何使它转化成一个有活性的酶。克劳特, J. (Joseph Kraut) 弄清了糜蛋白酶原的三维结构, 并对活化中某些构象变化进行了鉴定。

1. 精氨酸15和异亮氨酸16之间肽键的水解造成新的末端羧基和氨基。
2. 异亮氨酸16新生成的末端氨基转向内部, 并在糜蛋白酶分子内部与天冬氨酸194相互

作用（图8-20）。这个氨基的质子化使糜蛋白酶的活性形式趋于稳定，正如酶活性与pH的相依性所指出的那样。



3. 在非极性区域中带正电的氨基和带负电的羧酸根离子之间的这个静电互作用触发了一系列构象变化。甲硫氨酸192从酶原中深埋的位置转移到酶分子的表面，而残基187和193就变得比较伸展了。这些变化的结果形成具有底物专一性的部位，是为芳香族和大块的非极性基团准备的。这个部位的一侧是由残基189到192构成的。这个为部分底物准备的空腔在酶原中还没有全部形成。

4. 在糜蛋白酶催化作用中的四面体过渡态，通过带负电的羧基氧原子和两个主链NH基之间的

图8-20 天冬氨酸194和异亮氨酸16在糜蛋白酶中的环境。Asp194的羧酸根(斜线球)和Ile 16的 $\alpha$ -NH<sub>2</sub>基(黑球)之间的静电互作用对糜蛋白酶的活性是必需的。这些基团靠近电荷接力网络 [依据D.M. Blow and T.A. Steitz, x ray diffraction studies of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.* 39(1970): 86, Copyright © 1970 by Annual Reviews Inc.]

氢键趋于稳定（见图8-17）。其中有一个NH基在糜蛋白酶原中位置还没有放对，从而在酶原中氧负离子穴是不完全的。

5. 在分子其他地方的构象变化是很小的。因此，开动在蛋白中酶的活性，只要通过单个肽键的水解所触发的分立和高度局部的构象变化，就能实现。

### 胰蛋白酶和弹性蛋白酶：同一主题下的差异

胰蛋白酶和弹性蛋白酶在若干方面与糜蛋白酶相似：

1. 它们都是从胰脏作为酶原分泌出来的，并通过单个肽键的裂解而被活化。新的末端氨基转向内部，并与天冬氨酸194的羧酸根发生静电互作用。

2. 这三种酶中大约有40%的氨基酸顺序是相同的。对定位在这些酶内部的氨基酸残基来说，相同的程度甚至更高。

3. 它们都会被象DIPF这样的氟磷酸酯所抑制。胰蛋白酶和弹性蛋白酶也都有一个活性部位丝氨酸残基。实际上，这个丝氨酸周围的氨基酸顺序在这三个酶中都是一样的：Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro。

4. x射线研究指出，这三种酶的三级结构是很相似的（图8-21）。弹性蛋白酶和胰蛋白酶都有一个电荷接力网络，正如糜蛋白酶中那样。其中都含有一个氧负离子穴。

5. 这三种酶的催化机制几乎是相同的。它们都是高效催化剂，因为它们与反应的过渡态相结合。氧负离子穴和电荷接力网络是每种酶在促成短暂四面体中间物时的必要结构要素。

虽然结构和机制很相似，这些酶在专一性上却明显不同。糜蛋白酶要求一个芳香族或大块的非极性侧链。胰蛋白酶要求一个赖氨酸或精氨酸残基。弹性蛋白酶并不能裂解这些底物

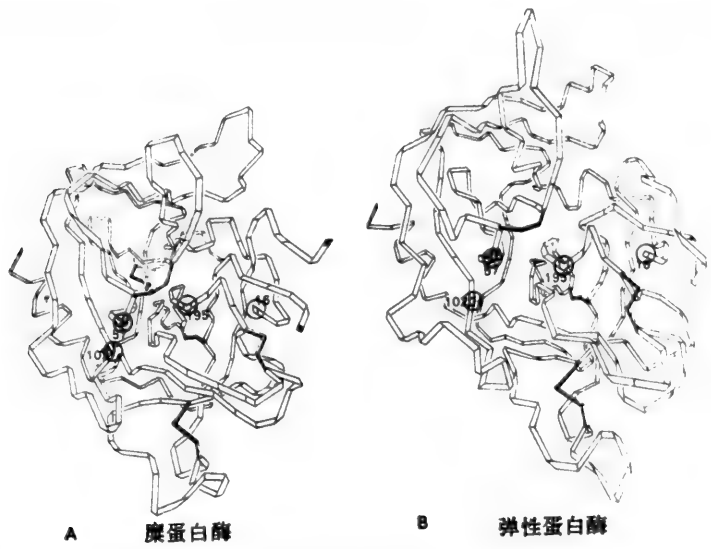


图8-21 对比(A)糜蛋白酶和(B)弹性蛋白酶的主链构象。电荷接力网络(残基102,57和195)以及残基16的 $\alpha$ 氨基的位置用圆圈标出,以便强调这些酶的相似性。[依据B. S. Hartley and D.M.Shorton, In *The Enzymes*, P.D.Boyer, ed., 3rd ed., vol.3 (Academic Press, 1971), p.362.]

中的任何一个。弹性蛋白酶的专一性指向较小的不带电的侧链。x射线研究已经指出，这些不同的底物专一性都来自结合部位上较小的结构变化(图8-22)。在糜蛋白酶中，一个非极性口袋起着安置芳香族或大块非极性侧链的壁龛的作用。在胰蛋白酶中，这个口袋中只有一个残基，与糜蛋白酶对比，已有了改变：一个丝氨酸已被一个天冬氨酸取代。这个在胰蛋白酶非极性口袋中的天冬氨酸能与底物的带有正电的赖氨酸或精氨酸侧链形成静电键。在弹性蛋白酶中，这个口袋已不复存在，因为糜蛋白酶中衬在其中的两个甘氨酸已被体积大得多的缬氨酸和苏氨酸所取代。

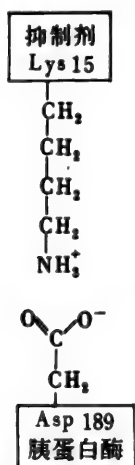
胰蛋白酶原活化中伴随的结构变化，是与糜蛋白酶原活化中产生的有所不同。休伯，R。(Robert Huber)和斯特劳德，R。(Robert Stroud)独立完成的x射线分析指出，约占整个分子15%的四段多肽，在活化中构象发生了显著变化。这些区域，称为活化域，在酶原中是很松软的，而它们在胰蛋白酶中却具有确定的构象。此外，氧负离子穴在胰蛋白酶原中与组氨酸57离得太远，无法促进四面体过渡态的形成。



图8 22 对糜蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶中底物结合部位极度简化的示意图。

## 胰腺胰蛋白酶抑制剂与胰蛋白酶的活性部位结合得很紧

胰蛋白酶类的活性是由两种独特的方式控制的。通过裂解单个肽键使一个酶原转化为蛋白酶是开动酶活性的精确方法。但这个活化步骤是不可逆的，从而需要一个不同的机制来停止蛋白水解作用。这就要通过专一的蛋白酶抑制剂来实现。例如，胰腺胰蛋白酶抑制剂是一个 6 kdal 的蛋白质，它靠能与活性部位结合得很紧来抑制胰蛋白酶（图 8-23）。这个复合



物的离解常数为  $10^{-13} \text{ mol/L}$ ，它所相当的标准结合自由能约为  $-18 \text{ kcal/mol}$ 。这个互作用的显著特色在于复合物被  $8 \text{ mol/L}$  脲或  $6 \text{ mol/L}$  盐酸胍处理后并不离解。这些变性剂几乎总会把蛋白低聚物离解为组成它们的亚基。复合体具有反常稳定性的原因，在于胰腺胰蛋白酶抑制剂是一个很有效的底物类似物。x射线分析指出，这个抑制剂中赖氨酸 15 的侧链与在酶的专一口袋中的天冬氨酸侧链相结合。此外，胰蛋白酶的主链和它的抑制剂主链之间形成了不少氢键。氢键的阵列与一个真正底物给出的很相似。特别重要的是抑制剂赖氨酸 15 的羰基和周围的原子都能相当好地适合酶的氧负离子穴。无论如何，复合体在催化的这个中间阶

图 8-23 胰腺胰蛋白酶抑制剂与胰蛋白酶互作用的一个明显特点，是抑制剂中赖氨酸 15 和酶的天冬氨酸 189 之间的静电键：赖氨酸 15 的  $-\text{NH}_3^+$  基也与胰蛋白酶专一口袋中的几个氧原子结成氢键。

段是被冻结的，可能因为胰蛋白酶的组氨酸 57 不能靠移动来向抑制剂的酰胺氮供给一个质子。胰腺胰蛋白酶抑制剂中赖氨酸 15 和丙氨酸 16 之间的肽键虽能被裂解，但速度很慢。这个胰蛋白酶-抑制剂复合体的半寿期是几个月。抑制剂对胰蛋白酶的亲和力很强，因为它的结构与胰蛋白酶活性部位的结构几乎互补得完美无缺。抑制剂在结合部位中受到限制的构象机动性起了阻挡催化的作用，并为复合体离解速度很低作出了说明。

## 丝氨酸蛋白酶的趋异进化和趋同进化

糜蛋白酶、弹性蛋白酶和胰蛋白酶具有相似的总氨基酸顺序，因为它们是从同一个祖先演化出来的。这个共同的祖先酶的基因可能复制过好几次了。这些基因产生的突变最后给出了今日的蛋白。通过基因的突变，从同一个祖先取得不同的专一性，称为趋异进化。

对比糜蛋白酶和一种细菌酶，即枯草杆菌蛋白酶，可以显示不同种类的进化过程。枯草杆菌蛋白酶也是一个丝氨酸蛋白酶。可是，糜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的氨基酸顺序却很不相同，这表明它们是在进化中独立发生的。例如，糜蛋白酶含有五个二硫键，而枯草杆菌蛋白酶则一个都没有。活性部位丝氨酸周围的顺序为

-Gly-Thr-Ser\*-Met-Ala-Ser （在枯草杆菌蛋白酶中）

-Gly-Asp-Ser\*-Gly-Gly-Pro （在糜蛋白酶中）

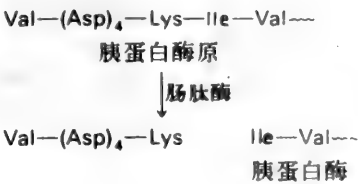
这些酶的三维结构完全不同。因此，令人惊异地发现，枯草杆菌蛋白酶有一个电荷接力网络，它很象糜蛋白酶中那个，也是由一个天冬氨酸、一个组氨酸和一个丝氨酸残基组成。此外，枯草杆菌蛋白酶含有一个氧负离子穴，它使四面体过渡态趋于稳定。枯草杆菌蛋白酶和糜蛋白酶中具有相似的电荷接力网络、氧负离子穴以及催化作用机制，是在酶分子水平上独立的趋同进化的一个生动实例。为什么脊椎动物的胰腺丝氨酸蛋白酶和细菌的枯草杆菌蛋白酶会



通过独立而平行的进化过程达到同一个答案呢?正如在本页下面谈到的,有效地裂解肽键的方法看来只有少数几种。对数百种已知蛋白水解酶进行的研究指出,总共可能只有四种主要的催化机制,而丝氨酸蛋白酶特别普遍。

胰酶原的激活过程是协调的

在十二指肠中消化蛋白需要几种蛋白水解酶同时作用,因为每一种只对几种侧链表现专一性。因此,各种酶原要同时开动。协调控制可以通过胰蛋白酶的作用来达到,而它是所有胰酶原——胰蛋白酶原、糜蛋白酶原、弹性蛋白酶原和羧肽酶原的通用激活剂。那末如何产生足量的胰蛋白酶来启动这些激活过程呢?衬在十二指肠内壁的细胞产生一种肠肽酶,它当胰蛋白酶原进入十二指肠时使其中唯一的赖氨酸-异亮氨酸肽键水解。这样产生的少量胰蛋白酶激活了胰蛋白酶原和其他酶原。因此,通过肠肽酶形成胰蛋白酶,是控制激活的步骤。



酶原的过早激活(如在胰腺炎中那样)可以是致命的

胰脏有几种办法免受自己合成的酶对它产生蛋白水解作用。所有胰脏产生的水解蛋白质的酶都是作为无活性的酶原来合成的。此外,它们被蛋白质和脂类构成的膜包在粒中。作为更进一步的安全措施,胰腺分泌物还含有抑制剂(130页),它能使胰脏中可能存在的少量胰蛋白酶失去活性。

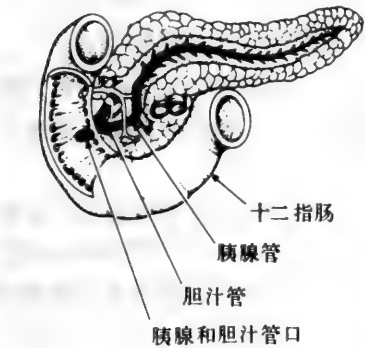


图8-24 胰腺及其与小肠关系的示意图。

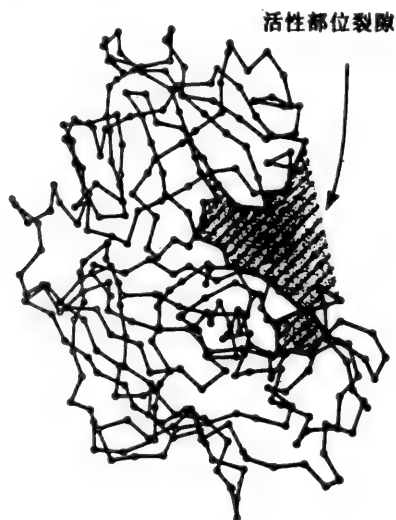
胰脏也分泌脂肪酶。其中之一的磷脂酶A<sub>2</sub>是作为原磷脂酶A<sub>2</sub>被合成的,并被胰蛋白酶所激活。其他裂解脂肪的酶在十二指肠中遇到胆汁盐时才被激活。这些类固醇能增溶脂类,并使后者更易被脂肪酶裂解。胆汁液在肝中合成,贮存在胆囊中,并释放入十二指肠中,与胰脏分泌的脂肪酶一同起作用。

急性胰腺炎是一种严重、有时是致命的疾病,它的特征为胰脏中蛋白水解酶和脂解酶的过早激活。患胰腺炎时,这些酶在胰脏中就被释放出来了。其结果是破坏了胰脏本身以及它的血管。使腺泡组织受到创伤能造成急性胰腺炎。

丝氨酸、锌、硫醇和羧基蛋白酶是蛋白水解酶的几个大家族

迄今只考虑了两类蛋白水解酶:以羧肽酶A为实例的锌蛋白酶(113页)以及丝氨酸蛋白酶。硫醇蛋白酶是另一个分布较广的族。从木瓜中得出的木瓜蛋白酶含有一个活性部位半胱氨酸,它起着与糜蛋白酶中丝氨酸195类似的作用。催化作用是通过一个硫醇酯中间物进行的,并受邻近的组氨酸侧链所促进。蛋白水解酶还有一大族是羧蛋白酶,它们也称为酸性蛋白酶,

因为它们大多只在酸性环境中具有活性。这一大族中最熟悉的成员是胃蛋白酶，它是胃液中一个主要的蛋白酶。胃蛋白酶的质量为34.6kDa，它是从胃蛋白酶原的氨基末端裂解除去一个



44个残基的肽形成的。激活过程在pH 2或更低时自动进行，它也能被胃蛋白酶所催化。因此，胃蛋白酶原在分泌入胃腔后数秒内就被转化为胃蛋白酶。胃蛋白酶的活性部位含有两个天冬氨酸残基。其中一个应被电离，而另一个不被电离，这样才能使酶取得活性，从而最适pH在2和3之间。具有相似结构和酶活性的羧蛋白酶已从细胞内进行消化作用(354页)的溶酶体和各种霉菌(图8-25)中分离出来。羧蛋白酶一个共同的特点是，它们会被浓度很低(约 $10^{-10}$  mol/L)的一个称为pepstatin的六肽过渡态类似物所抑制。

图8-25 来自根霉菌 (*Rhizopus*) 的酸性蛋白酶的活性部位。只示出了 $\alpha$  碳原子。活性部位在两叶之间的裂隙中，后者约可容纳底物的八个氨基酸残基。胃蛋白酶具有很相似的结构。[引自E. Subramanian, *Trends Biochem. Sci.*, 3 (1978), 2.]

### 一连串酶原激活过程造成凝块

通过肽键断裂来活化前体蛋白，是在许多生化体系中重复用于控制的基本手段。我们现在转向酶原活化在凝块形成中所起的作用，后者是三种止血机制之一。其他两种是迅速堵住受伤的血管和血小板在血管创口表面凝聚成栓塞。

凝块是通过一系列涉及十种以上不同蛋白的转化过程形成的。这个过程令人瞩目之处在于发生了一系列酶原活化。在这个酶的串级中，一个因子活化后接着就对下一个因子进行活化。由于活化过程的催化性质，起始因子只需要很小的量。步子一多，在逐级放大中会取得很大效果，从而保证了对创伤的迅速反应。

### 形成凝块需要两种酶途径的交互作用

在1863年利斯特, J. (Joseph Lister) 指出, 牛的颈静脉切断后其中的血液仍然能流动, 但一移入玻璃器皿后就会很快凝块。不正常的表面触发了血液已经存在的组分。因此, 这条凝块的途径称为内途径。凝块也可以由于加入了在正常情况下不存在于血液中的异物而受到触发。从各种组织, 特别是脑

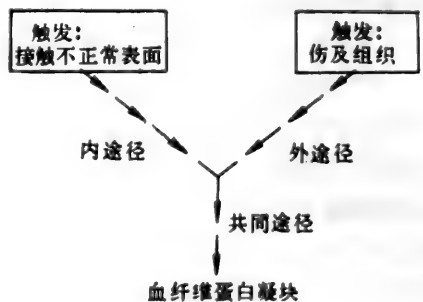


图8-26 生成血纤维蛋白凝块牵涉到三个途径的交互作用。

中所得的抽提物加入血浆中后，可以很快产生凝块。凝块的这条途径称为外途径。

凝块牵涉到内外途径的交互作用（图8-26）。对正常的凝块作用来说，这两条途径都是需要的。这不难从任一途径中缺少了一种蛋白所引起的各种凝块障碍中可见。而内外途径会合成一个共同途径，产生血纤维（蛋白）凝块。

### 血纤维蛋白原通过凝血酶转化成血纤维凝块

凝块过程中表征得最为明确的部分是血纤维蛋白原被一个称为凝血酶的蛋白水解酶转化为血纤维蛋白。血纤维蛋白原是一个比迄今讨论过的蛋白（如溶菌酶的糜蛋白酶）大得多和长得多的蛋白。电子显微照片示出，血纤维蛋白原是由两个杆连接起来的三个结节所组成的（图8-27）。血纤维蛋白长 $460\text{\AA}$ ，质量为 $340\text{ kdal}$ ，比糜蛋白酶要大十倍。它含有六条多肽链。有三种成对的链：其中之一称为 $A\alpha$ ，第二种为 $B\beta$ ，而另一种为 $\gamma$ 。

血纤维蛋白原是一种在血浆中溶解度很大的分子，通过凝血酶的蛋白水解作用被转化为不溶的血纤维蛋白单体。凝血酶裂解血纤维蛋白原中的四个精氨酸-甘氨酸肽键。释放出四个肽：从两条 $\alpha$ 链中各得一个含有18个残基的



图8-27 根据电子显微照片给出的血纤维蛋白原分子简图。

$A$ 肽和从两条 $\beta$ 链中各得一个含有20个残基的 $B$ 肽。这些 $A$ 和 $B$ 肽称为血纤维肽。一个血纤维蛋白原分子脱去这些血纤维肽后称为血纤维（蛋白）单体。它的亚基结构为 $(\alpha\beta\gamma)_2$ ，并占有约97%血纤维蛋白原中的氨基酸残基。

### 血纤维蛋白单体自发地形成纤维

血纤维蛋白单体的溶解度要比血纤维蛋白原母体分子低得多。它们自发地缔合成血纤维，血纤维是长而不溶的纤维状物。电子显微照片和低角x射线衍射图示出血纤维具有周期结构，其重复周期为 $230\text{\AA}$ （图8-28）。因为血纤维蛋白原的长度为 $460\text{\AA}$ ，很可能血纤维蛋白单体聚在一起形成一种错开一半的阵列（图8-29）。

为什么血纤维单体集聚，而它们的血纤维蛋白原母体分子却留在溶液中？确切的答案当来自正在进展中的详细结构研究。迄今研究过的所有脊椎动物的血纤维肽都带有很大的净负电荷。其中富集天冬氨酸和谷氨酸残基。酪氨酸的一个不寻常的带负电的衍生物，即酪氨酸- $\text{O}$ -硫酸酯出现在血纤维肽 $B$ 中。存在于血纤维肽中的这些和其他带负电的基团很可能使血纤维蛋白原互相分开。通过凝血酶它们被脱下后，

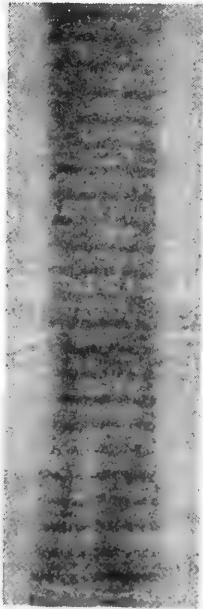


图8-28 血纤维的电子显微照片。纤维轴向的周期为 $230\text{\AA}$ ，正好是血纤维蛋白原分子长度的一半。〔蒙Dr. Henry Slayter特许。〕

使血纤维蛋白单体取得一个不同的表面电荷格局，从而导致后者独特的凝聚。回顾一下就可

以想到，只要改变一个带电的基，即谷氨酸换成缬氨酸，就可使脱氧血红蛋白分子在镰刀形红细胞贫血病中引起凝聚。

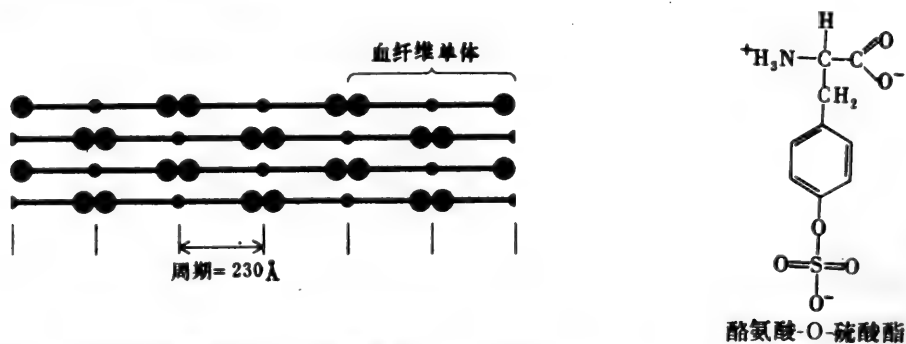


图8-29 血纤维单体在血纤维凝块中可能的排列方式。这种血纤维单体错开一半的阵列将给出观察到的周期为230Å。

### 血纤维凝块为共价交联所强化

血纤维蛋白单体自发凝聚产生的凝块是相当脆弱的。凝聚后又通过血纤维蛋白纤维中不同分子侧链之间生成的共价交联趋于稳定。事实上，肽键在转酰胺反应中于特定的谷酰胺和赖氨酸的侧链之间形成（图8-30）。这个交联反应为一个转酰胺酶所催化。这样的交联在蛋

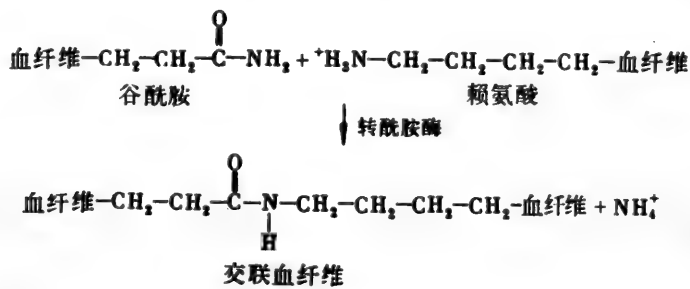


图8 30 血纤维在转酰胺反应中交联。

白中是很少见的。这个在血纤维中不寻常的键，其重要性当可以从下列发现中趋于明显：缺乏这种转酰胺酶的病人具有一种明显的出血倾向。

### 凝血酶是胰蛋白酶的系物

凝血酶对精氨酸-甘氨酸键的专一性说明，凝血酶很可能象胰蛋白酶。果然是这样，如氨基酸顺序的研究所示。凝血酶的质量为33.7kda1，含有两条链。A 链的49个残基与各种胰酶并不能觉察任何同系关系。而B链却在顺序上与胰蛋白酶、糜蛋白酶和弹性蛋白酶颇为相似。活性部位丝氨酸周围的顺序为Gly-A sp-Ser-Gly-Gly-P ro，这与胰丝氨酸蛋白酶中的完全一样。此外，凝血酶也包含一个电荷接力网络。它的三维结构尚属未知，但其专一性部位

的一个重要特色已经很明显。如同胰蛋白酶那样，凝血酶在它结合底物的沟的底部也有一个天冬氨酸的残基。这个带负电的基团无疑地是与带正电的精氨酸侧链形成一个静电键。凝血酶比胰蛋白酶要专一得多。凝血酶裂解某些精氨酸-甘氨酸键，而胰蛋白酶则断解跟在精氨酸或赖氨酸残基之后的几乎所有肽键。

与胰丝氨酸蛋白酶一样，凝血酶是作为一个66kda1的凝血酶原被合成的。一个精氨酸-苏氨酸键的蛋白水解断裂可从凝血酶原的氨端释放出一个32kda1的片段（图8-31）。再断裂一个精氨酸-亮氨酸键后就给出有活性的凝血酶。象糜蛋白酶中异亮氨酸16上带正电的氨基和带负电的天冬氨酸194之间形成的那一种离子对也存在于凝血酶中。

氨基酸顺序的相似性表明，凝血酶与胰丝氨酸蛋白酶在进化中是互有联系的。这一点由于存在一个电荷接力网络以及相似的活化机制而得到进一步证实。值得指出，凝血酶原形成于肝中，肝与胰具有共同的胚胎起源。

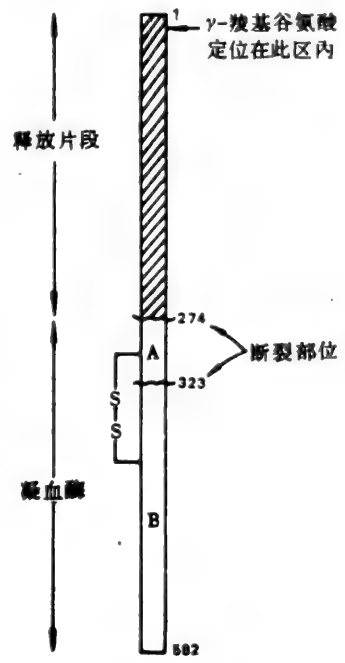


图8-31 凝血酶原的结构。断裂两个肽键（Arg274-Thr275和Arg323-Ile324）给出凝血酶。凝血酶原释放出来的氨端片段加斜线示出。所有γ-羧基谷氨酸残基都在这个片段上。凝血酶的A和B链由二硫键联在一起。

### 合成凝血酶原需要维生素K

很久以来就已知道，维生素K对合成凝血酶原和其他凝块因子是必不可少的。近年来研

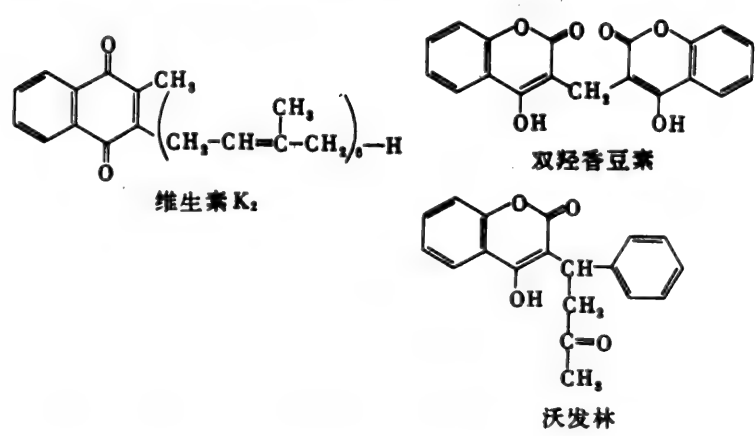


图8-32 维生素K<sub>2</sub>及其两个拮抗物，双羟香豆素和沃发林的结构式。

1 NH<sub>2</sub>  
 Ala  
 Asn  
 Lys  
 Gly  
 Phe  
 Leu  
 [Gla]  
 [Gla]  
 Val  
 10 Arg  
 Lys  
 Gly  
 Asn  
 Leu  
 [Gla]  
 Arg  
 [Gla]  
 Cys  
 Leu  
 20 [Gla]  
 [Gla]  
 Pro  
 Cys  
 Ser  
 Arg  
 [Gla]  
 [Gla]  
 Ala  
 Phe  
 30 [Gla]  
 Ala  
 Leu  
 [Gla]  
 Ser  
 35 Leu

究了在没有维生素K 或在象双羟香豆素这样的维生素K 拮抗物存在的情况下合成出来的反常凝血酶原，从而揭示了这个维生素的作用方式。双羟香豆素存在于腐败的甜三叶草中，用这样的草喂牲口时会生致命的出血性疾病。香豆素的这种衍生物在医疗中用作抗凝血剂，为易于形成凝块的病人防止血栓的形成。双羟香豆素以及象沃发林 (Warfarin) 这样与维生素K 有关的拮抗物也用作效力大的大鼠 毒药。喂了双羟香豆素的牛含有一种反常的凝血酶原，它与正常的不同，并不与Ca<sup>2+</sup> 结合。这个差异曾令人迷惑了一些时候，因为反常的凝血酶原在氨基酸残基数以及加酸水解后给出的氨基酸分析结果方面都与正常的酶原是一样的。从正常凝血酶原切成的片段中得出，它结合Ca<sup>2+</sup> 的能力是在它的氨端区域内 (图8-33)。从反常凝血酶原所得出的一个氨端肽在电泳迁移率方面与从正常分子所得者明显不同。这些肽的核磁共振研究指出，正常凝血酶原包含γ-羧基谷氨酸，

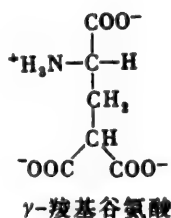


图8-33 凝血酶原氨端区的氨基酸顺序 [γ-羧基谷氨酸 (Gla) 残基加框示出]

是一种过去未知的氨基酸，而反常凝血酶原缺少这个修饰氨基酸。事实上，凝血酶原氨端区域中的头十个谷氨酸残基是通过一个依赖维生素K 的酶体系羧化为γ-羧基谷氨酸的。这个修饰氨基酸直到最近才被认识，因为γ-羧基在加酸水解时脱落，成为谷氨酸。

### 磷脂表面上的凝血酶原为X<sub>a</sub> 因子所活化

凝块过程的串级性质示出于图8-34。凝血酶原为一个称为因子X<sub>a</sub> 蛋白水解酶所活化。凝块因子用罗马数字标出，以利讨论。下标a指明因子是在有活性的形式中。凝血酶原通过因子X<sub>a</sub> 的蛋白水解作用转化为凝血酶。这个活化被因子V所加速，后者本身不是一个酶。因子V可以认为是一个修饰蛋白。

依赖维生素K 的羧化反应把作为Ca<sup>2+</sup> 的弱螯合剂的谷氨酸，转化为强得多的螯合剂γ-羧基谷氨酸。凝

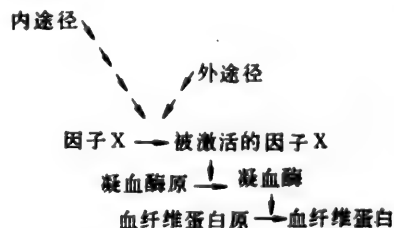


图8-34 生成血纤维凝块中的最后步骤。这三个反应构成共同的途径。因子X为内、外途径的产物所活化。

血酶原与Ca<sup>2+</sup>结合后被固定在创伤后从血小板引出的磷脂膜上。凝血酶原与磷脂表面的结合在功能上的意义在于后者将凝血酶原带到因子X<sub>a</sub>和V附近,它们能使凝血酶原的活化加速10<sup>4</sup>倍以上。含有Ca<sup>2+</sup>结合部位的凝血酶原的氨端片段,是在这个活化步骤中释放出来的。因此,凝血酶是从磷脂表面脱下,从而能对血浆中的血纤维蛋白原进行活化。

因子X是怎样被活化的呢?这一步活化进行于内、外途径会合处。内、外途径的产物都是使因子X活化的蛋白水解酶。

血友病和其他出血失控揭示了凝块的最早几步

凝块最早几步的生化研究比后续步骤要困难得多,因为早期凝块因子只以很小量存在。血纤维蛋白原在1ml血液中有3mg,而因子X只有0.01mg。某些更早的凝块因子浓度就更低了。此外,这些蛋白很不稳定。澄清凝块途径的重要突破来自对出血障碍病人的研究。

这些疾病中最熟悉的是血友病。这种凝血障碍是作为一个个性连锁隐性特征来遗传的。杂合女性是无症状的携带者。这种疾病的著名携带者曾是维多利亚女王(Queen Victoria),她将此病传给普鲁士、西班牙和俄罗斯王室(图8-35)。

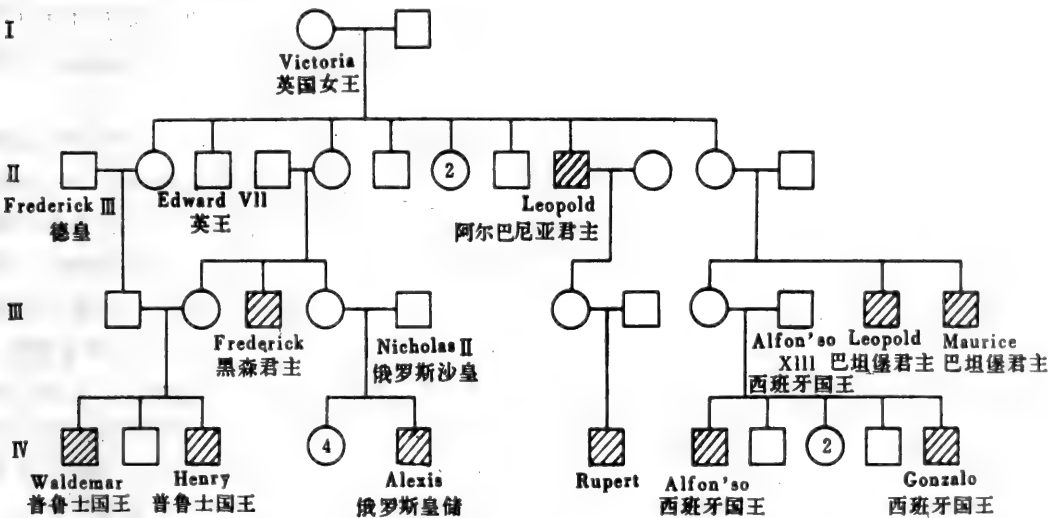


图8-35 在欧洲王室中血友病的谱系。图中包括V ictoria女王的所有儿女,但并非所有后代。女性用圆示出, 正常的和患血友病的男性分别用白方块和影线方块示出。[依据C .Stern. *Principles of Human Genetics*, 3rd ed. (W.H .Freeman and Company) .Copyright © 1973. ]

在1904年俄罗斯王储亚历克西斯(Alexis)出生。他是从十七世纪以来俄罗斯沙皇朝生出的第一个男性继承人,从而带来了希望的先兆。在他之前沙皇尼古拉斯二世(Nicholas II)和皇后亚历山德拉(Alexandra)生了四个健康的女儿,亚历山德拉皇后为维多利亚女王的孙女。但亚历克西斯出生六周以后喜悦的气氛消失了,他父亲在日记中写道:“这个早晨我们的小亚历克西斯竟无缘无故地开始从肚脐出血了。几乎没有停顿地持续到晚上。”当亚历克西斯开始爬行和学步时他腿上和臂上的大块大块青肿,使情况越来越清楚,预兆不祥。出血也越

来越严重，而且医生无法减缓这种病痛。极度苦恼的皇后就转向号称奇迹人物的Rasputin。当时既没有人懂得什么分子疾病，也就不会有人比别人更强。Rasputin在俄罗斯宫廷中之所以能多年居高位，就因为皇后对他的医道寄以极大的信任。

为什么尼古拉斯要与亚历山德拉结婚，当时已知她的兄弟、甥侄以及叔伯中有患血友病的？在1873年一个法国医生Grandidier建议“应劝告所有出血家庭的成员不要结婚”。诚然，这种疾病的遗传性质早在1803年就被奥托，J. (John Otto)充分意识到了：

大约在七十或八十年前，一个叫史密斯 (Smith) 的女人定居在普利茅斯 (Plymouth) 新罕布什尔 (New Hampshire)，附近，把下列特异体质传给她的后代。……这是一个令人惊奇的情况，只有男性会得这种奇怪的疾病，而他们中任何人都无需为此负责。……虽然女性得以幸免，但她们却仍能把这种病传给男孩。

霍尔登，J.B.S. (J.B.S. Haldane) 曾建议，“帝王要留心防范不愉快的现实。…俄罗斯王储的血友病是王权和现实分离的征兆。”

凝血的内途径

发生血友病的缺陷存在于内途径中 (图8-36)。一种称为抗血友病因子的蛋白缺掉了或则活性显然不够。抗血友病因子 (V III) 与作为蛋白水解酶的因子IX<sub>a</sub>协作来活化因子X。抗血友病因子本身并非酶，而是一个修饰因子蛋白。

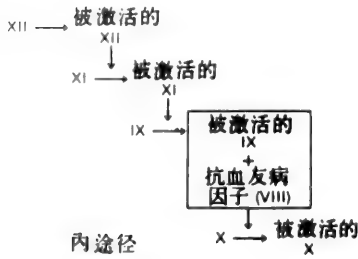


图8-36 凝血的内途径。因子活化后就催化其他因子的活化。

因子IX的发现经过很有意思。一个叫克里斯马斯，S. (Stephen Christmas) 的男孩患凝血障碍症，它在症状和遗传方式上无从与一般血友病区分。他的血液在玻璃管中凝血的时间与血友病的情况一样，显得较长。然后将他的血液与血友病人的混合在一起。令人瞩目的结果是，当这两种血液混合后凝血的时间几乎又是正常的了。

因此，很明显，克里斯马斯的分子缺陷不可能与血友病人的一样，即使他的临床现象几乎相同。这两种病人缺少的凝血因子应该是不同的，因为他们的血浆在凝血作用上正好可以互相补充。这样，就发现了以IX标志的新因子或克里斯马斯因子。一般来说，互补试验是很有威力的手段，它足以决定两个没有活性的体系是否缺少了同一个组分。互相补充的办法，其威力在于体系的组分在没有分离和提纯之前就可以列举出来了。互补试验广泛应用于细菌和病毒的遗传学中。

克里斯马斯因子在内途径中与起始的触发差两步。这个反应系列通过因子XII与反常表面接触后得以引发。活化后的因子XII<sub>a</sub>与激肽释放酶和激肽一起，将因子XI活化。而克里斯马斯因子 (IX) 被XI<sub>a</sub>活化。在这几步活化中，酶原被转化为有活性的酶。

凝血的外途径

如同在内途径中那样，外途径的最终结果是因子X的活化。外途径显得比较简单 (图8-37)。对血管的创伤会释放出一种称为组织因子的脂蛋白。组织因子与因子VII的复合物对



X的活化进行了催化。组织因子是一个修饰因子蛋白，因为因子Ⅶ在没有组织因子的情况下是没有活性的。因此，在凝血过程中至少有三个修饰因子蛋白：因子Ⅴ，因子Ⅷ和组织因子。

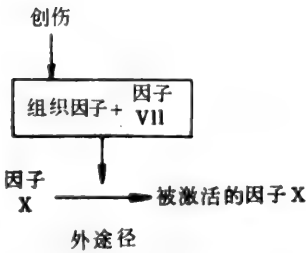


图8-37 凝血的外途径。

表8-2 血液凝结因子

因 子	途 径	活 化 形 式 的 功 能
哈格曼 (Hageman) 因子(Ⅻ)	内	活化Ⅻ
激肽释放酶		
激肽		
血浆促凝血酶原激酶前体 (PTA) (Ⅺ)	内	活化Ⅺ
克里斯马斯 (Christmas) 因子 (Ⅸ)	内	需要两者来活化X
抗血友病因子 (Ⅷ)		
组织因子	外	需要两者来活化X
转变加速因子前体 (Ⅶ)		
斯图尔特 (Stuart) 因子 (X)	共同	活化Ⅱ
促凝血球蛋白 (V)	共同	激促Ⅱ的活化
凝血酶原 (Ⅱ)	共同	活化血纤维蛋白原 (I)
血纤维蛋白原 (I)	共同	生成血纤维凝块
血纤维蛋白-稳定因子 (XⅢ)	共同	通过交联血纤维蛋白使凝块趋于稳定

控制凝血：一个挑战性的问题

很明显，凝血过程必须精确调节。出血和血栓形成之间只有一线之隔。凝块要进行得很快，但只能局限在损伤的区域。为什么有这么多个阶段？为什么有显然不同的内、外途径以及它们的关系如何？是什么机制把凝块生成限制在损伤部位的？这些迷人的问题不但本身很有意义，而且因为它们与防止和治疗心血管病有关，后者已成为一个重大的健康问题。

凝块因子活化的易变性对凝块的控制很起作用。活化后的凝块因子寿命短，因为它们为血流冲稀，被肝除去，为蛋白酶所降解以及被专一的抑制剂失去活性。最重要的抑制剂为抗凝血酶Ⅲ。它是一个血浆蛋白，能与凝血酶形成不可逆复合物，并且使凝血酶失活。这个复合物可能很象胰蛋白酶与它的胰抑制剂形成的稳定的酰基-酶复合物（130 页）。抗凝血酶Ⅲ也抑制凝块因子Ⅸ<sub>a</sub>，X<sub>a</sub>和Ⅺ<sub>a</sub>。抗凝血酶Ⅲ的抑制作用会通过肝素增强，后者为带负电的多糖（155 页），可在血管



图8-38 血纤维蛋白原修饰后形成有序的阵列的电子显微照片。[蒙Dr. Carolyn Cohen 特许。]

壁附近的肥大细胞中找到。肝素通过提高生成凝血酶与抗凝血酶Ⅲ之间不可逆复合物的速率来起抗凝血剂的作用。

## 概 要

蛋白质通过蛋白水解断裂一个或几个肽键来进行活化，它是生物体系中一个不断重现的控制机制。如果有活性的蛋白是酶的话，没有活性的前体称为酶原。了解得比较清楚的酶原活化是糜蛋白酶原转化成糜蛋白酶。胰蛋白酶水解糜蛋白酶原中残基15和16之间的肽键，从而将糜蛋白酶原转化为活性完全的糜蛋白酶。新生成的异亮氨酸的氨基转向内部，并与内部的天冬氨酸194形成一个静电键。这个互作用触发了一系列局部的构象变化，为结合底物的芳香（或大块的非极性）侧链创设了一个口袋。此外，形成了一个能使过渡态趋于稳定的氧负离子穴。

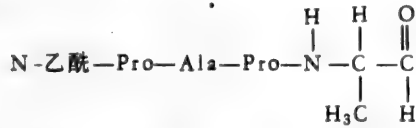
一个反应活性高的丝氨酸残基（丝氨酸195）在糜蛋白酶的催化机制中起着关键作用。肽底物水解的第一阶段是形成一个共价的酰基-酶中间体，其中底物的羧基与丝氨酸195的羟基酯化。这个酰基-酶中间体在催化作用的第二阶段进行水解。组氨酸57在酰化和脱酰反应中也起着关键作用。实际上，丝氨酸195通过一系列氢键变得亲核性很强。丝氨酸195与组氨酸57结成氢键，后者又在酶的内部与天冬氨酸102结成氢键。这三个残基构成一个电荷接力网络，使催化作用加速约 $10^3$ 倍。在胰蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血（蛋白）酶中也有这样的电荷接力网络。诚然，这些酶在氨基酸顺序、构象和催化机制方面都与糜蛋白酶很相似，但它们的专一性不同。同一主题上发生的这些变异，可能是由同一祖先进行的趋异进化所致。另外两个蛋白水解酶的家族为锌、硫醇和羧基蛋白酶。

酶原活化在控制血液凝块中也起着主要作用。凝块过程令人瞩目的特色在于它发生在一连串酶原转化之中，其中一个凝块因子活化后就会催化下一个前体的活化。凝块过程包含两个反应序列的交互作用，它们各称为内途径和外途径。正常的凝块作用需要它们两者一起参与。它们会合成为共同途径，导致一个血纤维蛋白凝块的生成。在血浆中一个易溶的血纤维蛋白原分子，通过4个精氨酸-甘氨酸键的水解转化为血纤维蛋白。这个反应为凝血酶所催化，后者与胰蛋白酶很相似，放出了两个A肽和两个B肽，约占血纤维蛋白原的3%。所得的血纤维蛋白单体就自发地形成长而不溶的纤维，称为血纤维蛋白。血纤维凝块后又通过专一的谷酰胺和赖氨酸侧链之间的转酰胺反应生成共价交联而得到加强。在凝血酶原和若干其他凝块因子中谷氨酸的羧化作用需要维生素K。通过 $\gamma$ -羧基谷氨酸与钙离子结合可以使凝血酶原固定在血小板膜上，并加速因子X<sub>a</sub>和V对它的活化。

## 习 题

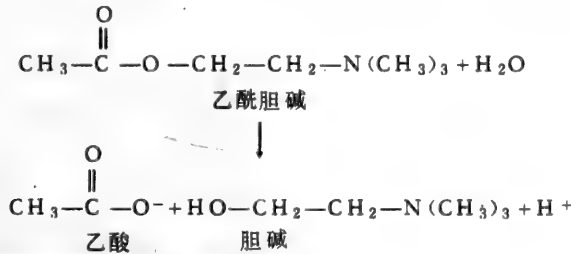
1. 请比较溶菌酶、羧肽酶A和糜蛋白酶。
  - (a) 其中哪个酶的催化活性需要一个金属离子？
  - (b) 哪个酶只含一条多肽链？
  - (c) 哪个酶很快被DIPF失去活性？
  - (d) 哪个酶是通过水解断裂一个与之相关的酶原后形成的？

- 从酶向它底物转移一个质子往往是催化作用中关键的一步。  
(a)这在糜蛋白酶、溶菌酶和羧肽酶A的催化机制中是否发生?  
(b)如果发生了,请指出每个场合中的质子供体。
- 底物常被酶的亲核基所进攻。在糜蛋白酶和羧肽酶A的机制中哪个是这样的亲核基?
- 请举出影响酶的催化能力的因素。
- TPCK是糜蛋白酶的亲和-标记试剂。它对组氨酸57烷基化后使糜蛋白酶失活。  
(a)为胰蛋白酶设计一个象TPCK那样的亲和-标记试剂。  
(b)你认为怎样可以检验它的专一性?  
(c)能被胰蛋白酶的这个亲和-标记试剂失去活性的还有哪个丝氨酸蛋白酶?
- 弹性蛋白酶为其底物之一的一个醛衍生物专一地抑制:

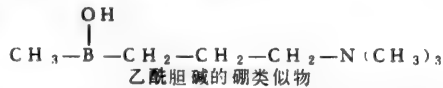


事实上,这个醛是弹性蛋白酶催化过程中过渡态的一个类似物。

- (a)在弹性蛋白酶的活性部位上哪个残基最可能与这个醛生成一个共价键?  
(b)将生成什么型式的共价键?
- 对形成酰基-酶中间物的酶来说,硼酸是另外一类过渡态类似物。乙酰胆碱酯酶是催化乙酰胆碱中酯键水解的酶:



乙酰胆碱酯酶被这个乙酰胆碱的硼类似物所抑制:



这个硼类似物是怎样通过共价键与乙酰胆碱酯酶的活性部位相联结的?

- 合成因子X,如合成凝血酶原一样,需要维生素K。因子X在其氨基端区也含有γ-羧基谷氨酸残基。但是,活化后的因子X与凝血酶相反,保留分子的这个区域。上述两种活化分子的这种差异在功能上会引起怎样的后果?
- 抗凝血酶Ⅲ与凝血酶形成不可逆复合物,但并不与凝血酶原形成这样的复合物。反应性能上的这个差别如何说明?
- 血纤维蛋白,如同肌球蛋白,角蛋白和表皮蛋白一样也含有缠绕在一起的α螺旋构成杆状物。这些α螺旋盘绕的卷曲(21页)含有重复着的七肽单位(abcdefg),其中残基a和d是疏水的。请为这种规则性提出理由。

# 第 9 章 结缔组织蛋白：胶原、弹性蛋白和蛋白多糖

所有多细胞生物含有胶原，这是一族纤维蛋白。诚然，这是哺乳动物最富有的一种蛋白，占总量的四分之一。胶原是皮肤、骨、腱、软骨、血管和牙齿的主要纤维成分。它以不同程度几乎存在于一切器官中，并用来使分立单位中的细胞连在一起。除了在成熟组织中所起的结构作用外，胶原对发育中组织有一种定向作用。胶原\*的独特之处在于它形成具有高抗张强度的不溶性纤维（图 9-1）。此外，胶原的结构基元可被修饰以适应具体组织的特殊需要。在共同主题上已有四种变异得到表征（表 9-1）。

表 9-1 胶原的类型

类 型	组 成	分 布
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$	皮肤、腱、骨、角膜
II	$[\alpha 1(II)]_3$	软骨、椎间盘、玻璃体
III	$[\alpha 1(III)]_3$	胎儿皮肤、心血管系统
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$	基底膜

## 原胶原是胶原的基本结构单位

胶原纤维之不溶性是多年来对胶原无法进行化学表征的原因。当得知从初生动物组织中可以抽提尚未广泛形成交联的可溶胶原时，这方面才有了突破。在未成熟胶原中既无共价交联，就很容易抽提完整的称为原胶原（tropo-collagen）的基本结构单位。

原胶原的质量约为 285kdal，由三条大小相同的多肽链组成。链的组成取决于胶原的类型（表 9-1）。类型 I 胶原是分布最广泛的一种，由一种类型的两条  $\alpha 1(I)$  和另一种类型的



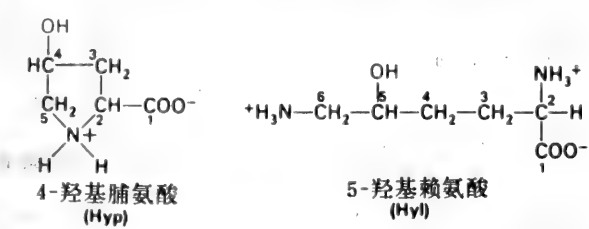
图 9-1 从皮肤中得出的完整胶原纤维的电子显微照片。制备时以铬造影。纤维轴向的周期为 640 Å。[蒙 Dr. Jerome Gross 特许。]

\*胶原——从希腊字中引出，意谓产生胶。

一条 $\alpha 2$ 链组成 胶原的其他类型都由三条相同的链组成。在形成胶原的三股多肽中，都约有一千个氨基酸残基组成。因此，胶原的基本结构单位是很大的——诚然，要比糜蛋白酶大十倍以上。

### 胶原具有不寻常的氨基酸组成和顺序

在一切胶原分子中，甘氨酸残基约占三分之一，这在蛋白中是高得不寻常的。例如，在血红蛋白中，甘氨酸含量为5%。还有，脯氨酸的含量也比在其他蛋白质中高得多。此外，胶原还含有两种其他蛋白少有的氨基酸，即羟基脯氨酸和羟基赖氨酸。



胶原的氨基酸组成特别规则：几乎每个第三残基总是甘氨酸。此外，甘氨酸-脯氨酸-羟基脯氨酸这样的顺序经常反复出现(图9-2)。相反，球蛋白的氨基酸顺序很少表现规则性。其他两种在顺序上具有一些规则性的蛋白为丝纤蛋白和弹性蛋白。



图9-2 胶原的 $\alpha 1$  (I) 链的部分氨基酸顺序。在一个跨越一千多个氨基酸的区域中，每个第三残基总是甘氨酸。

### 某些脯氨酸和赖氨酸残基被羟基化

羟基脯氨酸和羟基赖氨酸并不是通过通常的蛋白质合成机制参与多肽链的。如果将 $^{14}\text{C}$ 标记的羟基脯氨酸注射给大鼠，合成的胶原中并不表现任何放射性。相反，如果注以 $^{14}\text{C}$ 标记的脯氨酸时，胶原中的羟基脯氨酸就会具有放射性。因此，脯氨酸是胶原中羟基脯氨酸残基的前体，而外源羟基脯氨酸却不是。

胶原中某些脯氨酸残基通过脯氨酰羟化酶转化为羟基脯氨酸，这个酶在其活性部位上有一个亚铁离子。与脯氨酸的C-4相连的氧原子来自 $\text{O}_2$ 。 $\text{O}_2$ 中的另一个氧原子出现在琥珀酸中，后者从这个反应的当然底物 $\alpha$ -酮戊二酸中生成(图9-3)。因此，脯氨酰羟化酶是一

个双氧酶。这个羟化反应有一个值得指出的特色，即为了维持铁原子在亚铁态需要一个象抗坏血酸（148页）这样的还原剂。

这个羟化反应专一性很强。脯氨酸作为一个游离氨基酸时并不能成为底物。而羟化发生在较大的多肽链成为螺旋前的特定部位上。脯氨酸只有当它在甘氨酸残基的氨侧时才能在C-4上被羟化。此外,有些脯氨酸残基在C-3上被另外一个酶羟化。而这些脯氨酸位于甘氨酸残基的羧侧。

胶原中一小部分赖氨酸残基在C-5上可以通过赖氨酸羟化酶的作用进行羟化。与脯氨酸的羟化相似，也需要氧分子、α-酮戊二酸和抗坏血酸。赖氨酸这样的修饰总发生在甘氨酸残基的氨侧。

### 糖连在羟基赖氨酸残基上

胶原含有碳水化合物单位，它们通过共价键结合在胶原的羟基赖氨酸残基上。通常发现的是葡萄糖和半乳糖形成的二糖(图9-4)。这些糖是通过半乳糖转移酶和葡萄糖转移酶循序进行的作用插进去的。这些糖化酶的专一性是针对在取得螺旋构象前的初生态胶原中羟基赖氨酸残基的。不同组织的原胶原中碳水化合物的单位数是可以不同的。例如，腱胶原（类型I）包含6个，而晶状体囊（类型IV）有110个单位。

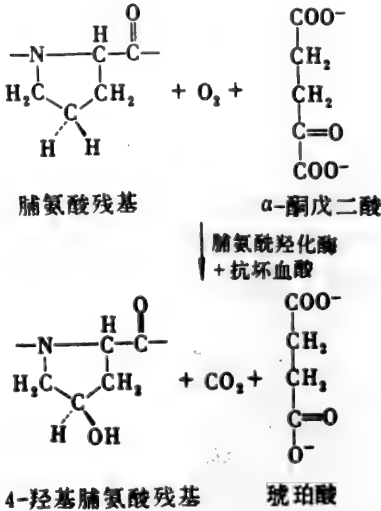


图9-3 脯氨酸残基在C-4上通过能使氧分子活化的脯氨酸羟化酶进行羟化反应。

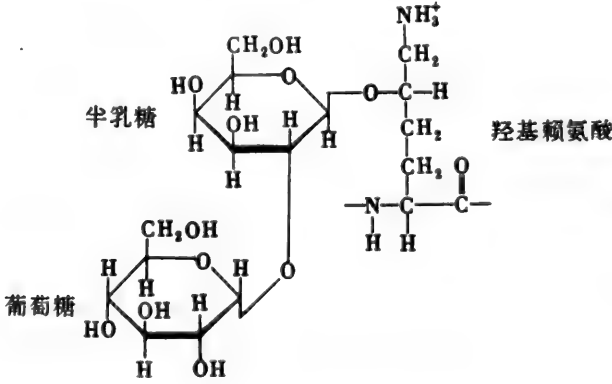


图9-4 胶原中的一个碳水化合物单位。

### 原胶原是一个三股的螺旋杆

现在将话题转向类型I胶原纤维基本结构单位的构象。电子显微镜和流体动力学研究指明，原胶原是一个长为3000Å和直径为15Å的杆状物。这是已知为最长的蛋白质之一。它伸

得很长这个特征可以这样来体会：原胶原的长度要比糜蛋白酶的直径大60倍，而直径还不到糜蛋白酶的一半。三条多肽链都具有螺旋构象（图9-5）。此外，三股螺旋互相缠绕形成一个坚硬的缆。诚然，胶原纤维的强度很引人瞩目：至少要10kg的负载才能使直径为1mm的纤维断裂。

三股胶原缆中每个链的螺旋基元，可以通过一个模型化合物多聚-L-脯氨酸，很好地揭示出来。这个合成的多肽具有一种与 $\alpha$ 螺旋完全不同的螺旋形式（图9-6）。在多聚-L-脯氨酸螺旋中没有氢键。这个螺旋却是通过脯氨酸残基的吡咯烷酮环的空间斥力稳定下来的。当

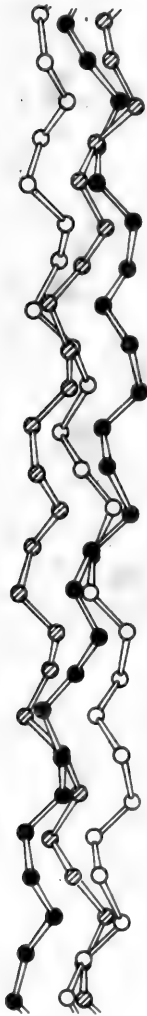


图9-5 三股胶原螺旋的模型。  
只示出 $\alpha$ 碳原子。

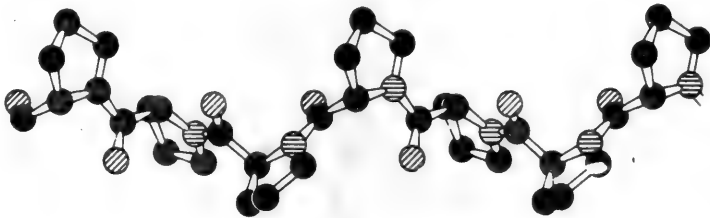


图9-6 多聚-L-脯氨酸螺旋（类型II反螺旋）模型。这种螺旋是原胶原三股中每股的基本结构基元。

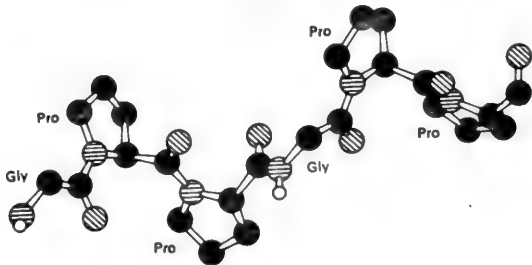


图9-7 胶原三股螺旋中单股的构象。这里示出的顺序为-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro。

多肽链采取这种比卷曲得很紧的 $\alpha$ 螺旋开放得多的螺旋形式（已知为类型II反螺旋）时，吡咯烷酮环就会互相错开。沿多聚-L-脯氨酸的螺旋轴，每个残基上升 $3.12 \text{ \AA}$ ，而在 $\alpha$ 螺旋中为 $1.5 \text{ \AA}$ 。在多聚-L-脯氨酸螺旋中每圈有三个残基。

现在看一下三股胶原螺旋中单股的构象（图9-7）。每一股有一个象多聚-L-脯氨酸示

出的螺旋构象。三股互相缠绕，形成一个超螺旋缆（图9-8）。在这个超螺旋中每个残基上升2.9 Å，而每一圈约有3.3个残基。这三股互相结成氢键。氢供体是甘氨酸残基的肽键NH基，而氢受体为其他链上残基的肽键CO基。氢键的方向是横对着原胶原杆的长轴的。羟基脯氨酸残基的羟基和水分子也参与使三股螺旋稳定的氢键。三股胶原螺旋的空间填充模型示出于图9-9中。

图9-8 三股胶原螺旋的骨骼模型。这里示出重复的顺序为-Gly-Pro Pro。

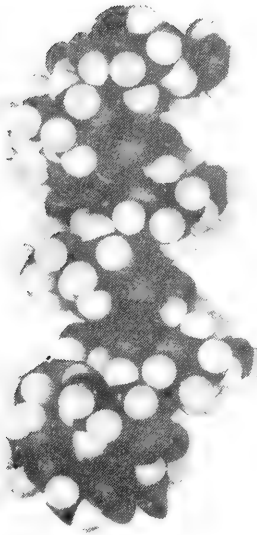
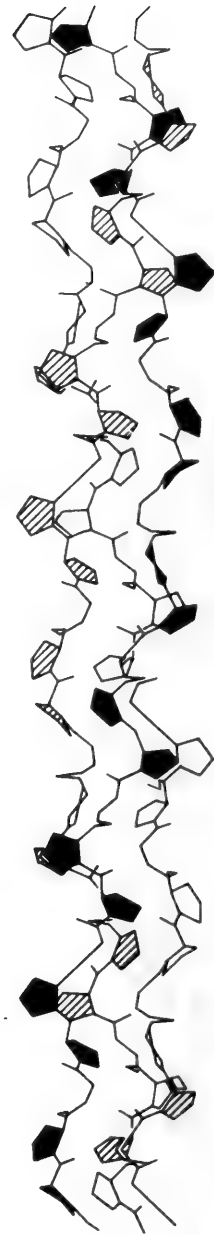


图9-9 胶原三股螺旋的空间填充模型。[蒙Dr. Alexander Rich特许。]

### 甘氨酸由于小而成为必不可少

我们现在可以看到，为什么在原胶原的氨基酸顺序中甘氨酸总占据每个第三位。三股胶原螺旋缆内部是很拥挤的（图9-10）。事实上，唯一能适合内部位置的残基是甘氨酸。螺旋每一圈有三个残基，从而每股上第三个残基必为甘氨酸。甘氨酸两侧的两个氨基酸残基位



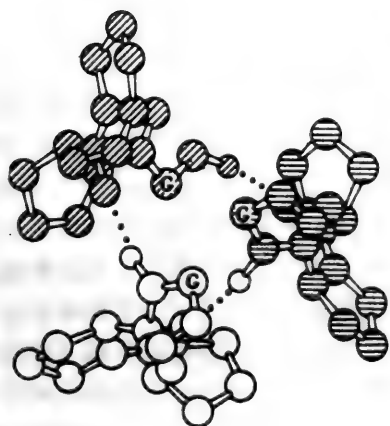


图9-10 胶原模型的一个截面。每一股与其他两股结成氢键（...代表一个氢键）。每股中甘氨酸残基的 $\alpha$ -碳原子标以G。每个第三位必为甘氨酸，因为螺旋轴（中心）附近容纳不了更大的氨基酸残基。注意，吡咯烷酮环在外侧。三重螺旋的每一股分别以斜线球、横线球和空心球示出。

于缆的外侧，那里脯氨酸和羟基脯氨酸残基大块的环很易安置。

我们可能会想到，由于侧链只有一个氢原子，甘氨酸是一个无足轻重的和最不足道的氨基酸。然而，在蛋白结构中，简单有时却变得十分有利。甘氨酸之所以重要，正因为它占据很少空间，从而各股多肽可以绕在一起。我们早已在肌红蛋白和血红蛋白中看到这一点，在那里甘氨酸B6是不变的，因为它允许B和E螺旋能互相靠近。在糜蛋白酶中，结合底物的空腔能容纳一个大块的芳香基，因为衬在腔内的两个残基为甘氨酸。在电子载体细胞色素*c*进化时，最保守的氨基酸残基是甘氨酸。这里，我们又在胶原中看到甘氨酸的关键作用在于扩大多肽链折叠中被允许的构象的范围。

### 胶原螺旋的稳定性取决于协同相互作用

当加热原胶原的溶液时，物理性质的较大变化发生在一个特征温度（图9-11）。例如，溶液的粘度

急剧下降，表明分子已经失去其杆状外形。旋光性的改变也表示各股的螺旋结构已破坏。因此，热运动能克服使三股螺旋稳定的力，给出一个结构被破坏并称为白明胶的无规线团。这个结构变化在某一温度突然发生，很象晶体熔解时的情况。熔解这个术语被带进生物化学来代表这样的过程，其中高度有序的结构于较窄的温度范围内丧失。原胶原螺旋在杆的长轴方向是高度有序的。随温度上升发生的急剧变化说明，三股螺旋是被协同相互作用稳定的。换言之，螺旋结构是许多加强键产生的后果，而它们的每一个都是比较弱的。形成任何一个这样的加固键在很大的程度上要取决于邻近的键是否也能形成。拉链是一个协同结构的实例。在以后的章节中，将讨论其他高度协同的大分子结构，诸如DNA、病毒和细胞膜等。

### 螺旋结构丧失到一半的温度称为熔解温度

（ $T_m$ ）。原胶原的 $T_m$ 是其螺旋结构稳定性的一个判据。对完整的胶原纤维来说，相仿的指标为收缩温度（ $T_s$ ）。从不同物种取得的胶原具有不同的熔解温度。实际上，胶原的 $T_m$ 或 $T_s$ 与来源物种的体温有关（表9-2）。从冰鱼中取得胶原具有最低的 $T_m$ ，而从温血动物中取得的具有最高的 $T_m$ 。热稳定性的这种差异是与胶原中亚氨基酸（脯氨酸加羟基脯氨酸）的含量相关联的。亚氨基酸含量越高，螺旋就越稳定。在从冷血进化为温血物种的进程中，胶原的亚氨基酸含量增加了。

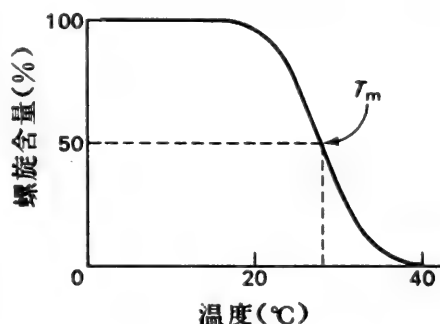


图9-11 胶原分子的熔化曲线。

表9-2 热稳定性对亚氨基酸含量的相依性

来 源	脯氨酸加羟基脯氨酸 (每1000个残基中)	热稳定性 (°C)		体温 (°C)
		$T_i$	$T_m$	
小牛皮	232	65	39	37
鲨鱼皮	191	53	29	24—28
鳕鱼皮	155	40	16	10—14

简言之，原胶原单股螺旋结构的稳定性取决于脯氨酸和羟基脯氨酸残基的连锁效应。三重螺旋进一步被不同股上残基间的横向氢键和范氏相互作用所加固。超螺旋在空间上是被允许的，因为甘氨酸在氨基酸顺序上占据每一个第三位。

认识到脯氨酸羟化的生物学意义，为研究胶原的合成多肽模型的溶解温度提供了信息。多聚-(Pro-Pro-Gly)的 $T_m$ 是24°C，而多聚-(Pro-Hyp-Gly)的为58°C。这说明，三重螺旋明显地被羟化作用所加固。脱羟基胶原的性质支持这个结论。制备这样的胶原，可以将腱细胞与 $\alpha$ ， $\alpha'$ -二吡啶基一起温育，而后者是一个铁的螯合剂，它能抑制脯氨酰羟化酶。从这些细胞中合成的脱羟基胶原在37°C下并不形成三重螺旋，而当冷却到24°C以下时就很快成为螺旋结构。

### 羟化不完全是坏血病中的一个生物化学损伤

胶原羟化作用的重要性在坏血病中变得昭然若揭了。卡蒂埃，J.(Jacques Cartier) 在1536年曾对这种疾病给出一个生动的描述，当时他的雇工在对圣劳伦斯(Saint Lawrence)河勘察中得了这种疾病：

有的失去了他们的力量，以致不能站起来…其他人皮肤上出现紫色血液的斑点，然后上升到他们的踝节、膝盖、大腿、肩膀、手臂和头颈。他们口中发恶臭，他们的牙床溃烂到肉都要掉下来，一直到牙根，后者也差不多都要掉出来了。

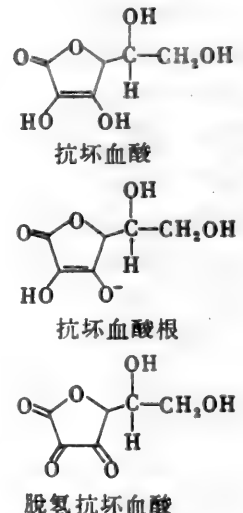
一个英国医生，林德，J.(James Lind) 在1753年简单地讲述了防止坏血病的方法：

经验确已充分说明，绿色或新鲜蔬菜以及成熟的水果是对它最好的药物，从而也是最有效的预防药物。

林德建议在水手的饮食中加入柠檬汁。英国海军大约在四十年后采纳了他的意见。

坏血病是在饮食中缺少抗坏血酸（维生素C）后发生的。灵长类和豚鼠已经失去合成抗坏血酸的能力，从而要从它们的饮食中取得。作为一个有效的还原剂，抗坏血酸（图9-12）可能由于把铁原子维护在还原的亚铁态中而使脯氨酰羟化酶不致失去活性。在没有抗坏血酸的情况下合成的胶原羟化不够充分，从而溶解温度较低。这种不正常的胶原不能正常地形成纤维，因此造成坏血病中如此严重的皮肤损伤和血管脆裂。

图9-12 抗坏血酸（维生素C）和抗坏血酸根的结构式。抗坏血酸中酸性羟基的 $pK_a$ 为4.2。脱氢抗坏血酸是抗坏血酸根的氧化形式。



## 溶胶原是胶原的生物合成前体

三股的类型 I 胶原螺旋在活体中装配得很快。与此相反，这个过程在体外从组分 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 2$ 链的溶液中进行时则需以日计。而且，产率很低。为什么原胶原螺旋在体外和体内装配时发生这样明显的差别呢？对比变性的糜蛋白酶原和糜蛋白酶重新折叠的情况可以对我们有所启发。伸展的酶原可以自发地重新折叠成正确的三维结构，而酶却不行。原因在于糜蛋白酶中缺少了需要用来规定三维形式的那部分结构；有两个二肽在活化过程中被裂解掉了。

可以猜想， $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 2$ 链并不自发地形成正确的原胶原结构，因为缺少了一部分信息。事物确实如此。组成胶原的链也是按较大的前体来合成的。 $\alpha 1(I)$ 链的前体称为pro- $\alpha 1(I)$ ，质量为140kdal，而 $\alpha 1(I)$ 的质量为95kdal。在pro- $\alpha 1(I)$ 链的氨端和羧端两头都增添了肽段（图9-13）。同样， $\alpha 2$ 链也是按质量为140kdal以及称为pro- $\alpha 2$ 的前体来合成的。在pro-

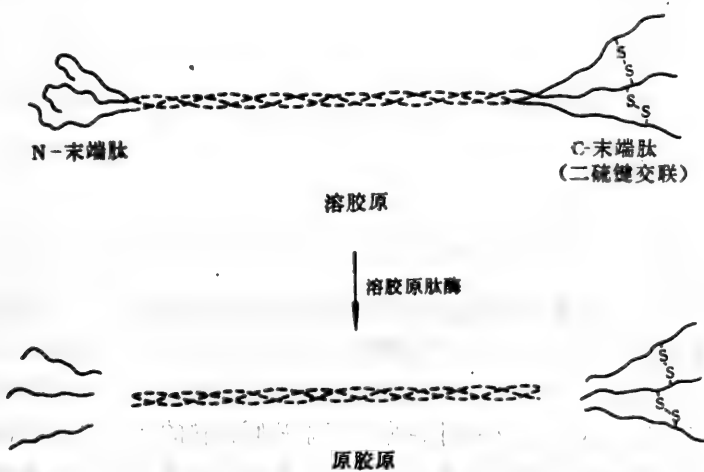


图9-13 从三条链上各切除氨端肽段（约15kdal）和羧端肽段（约30kdal）后，溶胶原转化为胶原的示意图。三股溶胶原的羧端区被二硫键所联结。

$\alpha 1(I)$ 和pro- $\alpha 2$ 中增添的肽段具有与链的其余部分很不相同的氨基酸组成。它们并不富含甘氨酸、羟基脯氨酸和脯氨酸。pro- $\alpha 1(I)$ 和pro- $\alpha 2$ 的氨端肽段独特之处在于含有链内二硫键。此外，这些前体链的羧端区被胶原中没有的链间二硫键所联结。

### 前体链上增添的肽段是被酶切除的

pro- $\alpha 1(I)$ 和pro- $\alpha 2$ 链是由成纤维细胞合成，并分泌到结缔组织的细胞外空间中去的。这些前体链上增添的氨端和羧端肽区然后被专一的蛋白水解酶所切除，后者称为溶胶原肽酶。

前体链在向 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 转化时的缺陷能导致结缔组织的广泛性障碍。例如，埃勒-丹洛斯（Ehlers-Danlos）综合症患者的皮肤松弛，关节过分活动和身材矮小。这种疾病的患者在他们皮肤和肌腱的抽提物中含有较多的溶胶原（图9-14）。此外，成纤维细胞中溶胶原肽酶的水平较低。真皮脆弱病（Dermatospaxis），牲畜的一种遗传（隐性）疾病，是由于没有溶胶

原肽酶造成的。染病动物的真皮很脆，因为它含有混乱的胶原束。在其成熟型 I 胶原中相当大一部分系由保留着溶胶原氨端区的  $\alpha 1(I)$  和  $\alpha 2$  链组成。这种疾病指明，对有序地形成胶原纤维来说，切除这些氨端肽段是十分重要的。

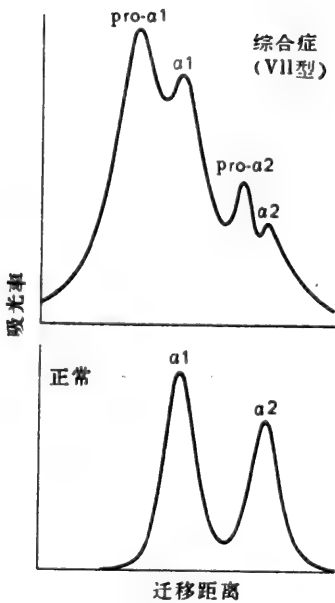


图 9-14 皮肤抽提物的丙烯酰胺凝胶电泳图。数量可观的溶胶原 (pro- $\alpha 1$  和 pro- $\alpha 2$ ) 存在于型 VII 埃勒-丹洛斯综合症患者皮肤的酸性抽提物中，而在正常人的对比物中没有发现。[ 依据 J. R. Lichtenstein, G. R. Martin, L. D. Kohn, P. H. Byers, and V. A. McKusick, *Science* 182 (1973): 299. Copyright 1973 by the American Association for the Advancement of Science. ]

### 胶原纤维是互相错开的原胶原分子形成的阵列

原胶原纤维以特定的方式自发地缔合成胞外空间中的胶原纤维。纤维的几何状况已从 x 射线和电子显微镜研究中引出。胶原纤维每隔  $680 \text{ \AA}$  就出现截条纹 (如图 9-1 中所示)。与此相反，原胶原分子的长度为  $3000 \text{ \AA}$ 。纤维周期比组成它的分子的长度小几倍这一事实指明，原胶原分子在邻接的列中并不是互相对齐的。而原胶原邻接的各列之间约错开基本单位长度的四分之一。胶原纤维的基本结构设计是原胶原分子互相错开四分之一后所得的阵列 (图 9-15)。这样的排列使我们想到 (音乐中的) 赋格曲 (图 9-16)。

一个有意思的结构特色是原胶原分子在同一列中并不是末端之间互相衔接的。一个原胶

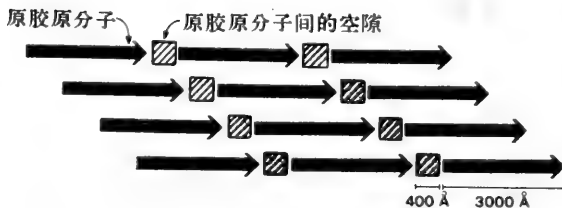


图 9-15 一个胶原纤维的基本结构设计的示意图。原胶原分子 (以黑色箭头示出) 形成一个错开四分之一的阵列。每一列中原胶原分子之间的空隙 (以方块表示) 可能是骨骼形成时的成核部位。



图 9-16 巴赫, J. S. (J. S. Bach) 的 D 大调钢琴赋格曲中的一段。[ 依据 R. Erickson, *The Structure of Music: A Listener's Guide* (Noonday Press, 1955), P. 130. ]

原分子的尾与另一个分子的头之间留有400 Å的空隙（图9-15）。这个空隙可能在成骨时是起作用的。骨是由一个有机物相和一个无机物相组成的，前者几乎全为胶原，而后者为磷酸钙。具体地说，结构与组成为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 的羟基磷灰石相似。胶原需要磷酸钙晶体的沉积以成骨。实际上，起始晶体是在680 Å的间隔中找到的，后者为胶原纤维的周期。同一列上胶原分子之间的空隙是骨的矿物相成核的部位。

### 溶胶原肽酶控制纤维的生成

溶胶原分子并不象原胶原分子那样能自发缔合成纤维。对形成正常胶原纤维来说，切除氨端和羧端肽段是很必要的。因此，生成胶原纤维与生成血纤维蛋白纤维是很类似的。溶胶原之与血纤维蛋白原的相似性正如原胶原之与血纤维蛋白单体以及溶胶原肽酶之与凝血酶。在这两个体系中，纤维的生成都需要专一的蛋白水解酶的裂解。

成纤维细胞分泌的是溶胶原，而不是原胶原（图9-17）。生物合成和分泌的途径，很象

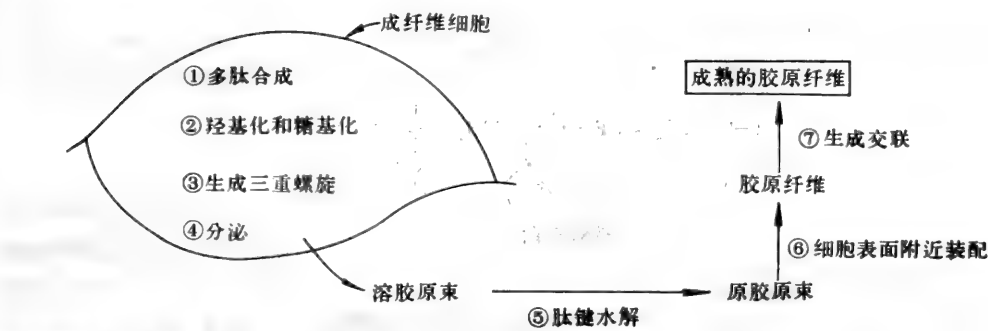


图 9-17 生成成熟的胶原纤维的步骤。

胰酶原（119 页）以及其他被输出的蛋白（557 页）所有的那种途径。胶原纤维的生成是在细胞表面附近的胞外流体中进行的，而由于溶胶原肽酶在外部，就不可能在成纤维细胞内进行了。前体链上增添的肽区防止纤维在成熟前提早形成。这些肽区也可能引导溶胶原穿过成纤维细胞的半透壁向外输出。它们早期的作用在于使三条链对齐以利三重螺旋的形成。链间二硫键在这方面是特别重要的。

### 胶原纤维通过交联而加固

如同血纤维蛋白一样，胶原也因生成共价交联而加固。在胶原纤维中生成两类交联：分子内（在原胶原单位内部）和分子间（不同原胶原单位之间）的交联。所形成的键是胶原和一个有关的蛋白，即弹性蛋白所独有的。

胶原中分子内交联是从赖氨酸的侧链引出的。第一步是将赖氨酸的ε-氨端转化为醛。此反应为赖氨酸氧化酶所催化。两个这样的醛随后进行醛醇缩合（图9-18）。在这个缩合反应中，从一个醛得出的烯醇根离子加到另一个醛的羰基上。这个分子内交联的位置是很有意思的。胶原α1(I)链上氨端肽段的氨基酸顺序指出，从13位开始，每个第三位残基是甘氨酸。因此，赖氨酸5是在多肽链的非螺旋区，靠近三股螺旋的起始部位。这个非螺旋片段的可变

性可能有助于这种交联的形成。

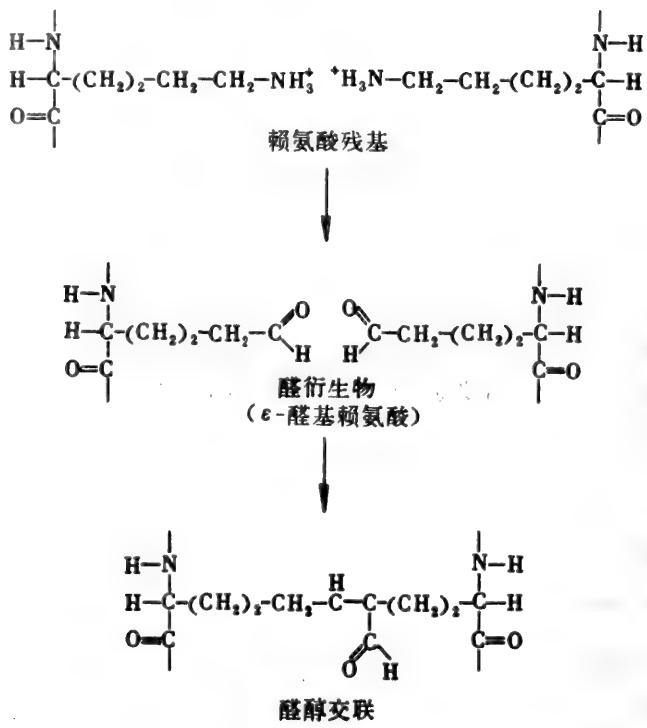


图 9-18 从两个赖氨酸侧链形成一个醛醇交联。

这个醛醇交联能与组氨酸侧链反应，形成组氨酸-醛醇交联（图9-19）。醛醇-组氨酸交联还能与另一个侧链，如羟基赖氨酸的侧链形成一个希夫氏(Schiff)碱。这样，四个侧链就能互相共价结合在一起了。其中有些交联可以生成于不同原胶原分子的侧链之间(图9-20)。

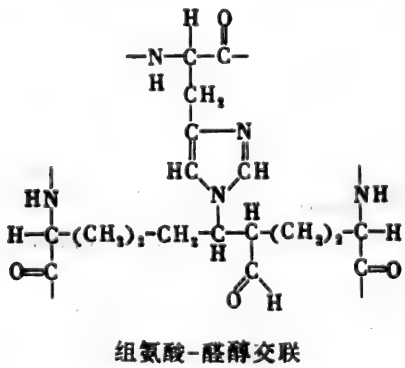


图 9-19 组氨酸侧链可以插入醛醇交联中的碳-碳双键内，给出组氨酸-醛醇交联。

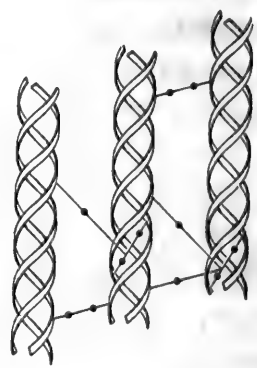


图 9-20 胶原中分子内和分子间的交联。[依据 M. L. Tanzer, *Science* 180 (1973): 562. Copyright 1973 by the American Association for the Advancement of Science.]

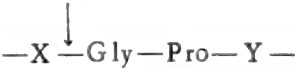
交联的程度和型式随组织的生理功能和年龄而变化。在成年大鼠的Achilles腱中胶原是高度交联的，而在机动的尾腱胶原中交联程度就要低得多。交联对提高胶原纤维机械强度的重要意义在山黧豆中毒(lathyrism)中比较明显，这是动物咽下一种甜豆(*Lathyrus odoratus*)后引起的一种疾病。其中的毒素是β-氨基丙腈，它抑制赖氨酸侧链转化成醛的反应。因此，这些动物中的胶原特别脆弱。



### 胶原酶是专一地降解胶原的酶

胶原酶是裂解胶原特定螺旋区中肽键的酶。胶原分子对其他酶的进攻是很能抵挡的。已知有两种类型的胶原酶。

1. 有一类是由某些微生物生成的。溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)是一种引起气体坏疽的微生物，它分泌一种能使胶原的每条多肽链在二百多个部位上裂解的酶。这种细菌酶所裂解的键为



这种酶使这个致病的梭菌(*Clostridium*)具有很强的侵袭性，因为它能破坏寄主的结缔组织所形成的屏障。这种细菌本身不受这种酶影响，因为它不含胶原。

2. 组织胶原酶是另一类这样的酶。它存在于两栖和哺乳类正在生长或改建的组织中。这种酶的活性首先在变态中蝌蚪的尾鳍中觉察到(图9-21)。在几天之中尾鳍组织溶解了大量胶原。检定胶原降解活性，可以将变态中的



图9-21 在变态过程中胶原迅速从蝌蚪的尾鳍中消失。  
[引自C. M. Lapiere and J. Gross, In *Mechanisms of Hard Tissue Destruction*, R. F. Sognnaes, ed., p. 665. Copyright 1963 by the American Association for the Advancement of Science.]

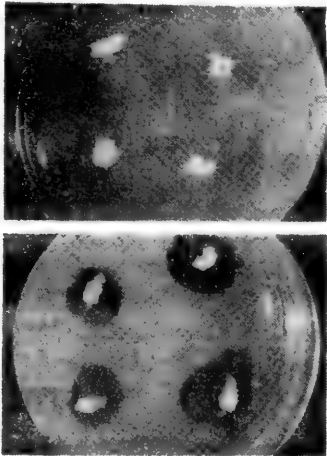


图9-22 从蝌蚪鳍移植出来的小块放在重组的胶原凝胶上(上)。在37℃保温24小时后每块移植植物周围有一个清澈区，指明胶原酶的活性(下)。  
[引自C. M. Lapiere and J. Gross, In *Mechanisms of Hard Tissue Destruction*, R. F. Sognnaes, ed., p. 681. Copyright 1963 by the American Association for the Advancement of Science.]

小块尾鳍放在一层不透明的纤维胶原上培养。在数小时内出现清澈区域，说明有高水平的胶原酶存在（图9-22）。正在进行迅速重组的哺乳类组织中，如怀孕后的子宫中，可以找到胶原酶的高活性。显然，必须在时间和大小上精确控制组织胶原酶的活性。

蝌蚪胶原酶的专一性引人注目。它使原胶原的三条链上处于1000残基中氨基酸残基750附近的那个唯一部位断裂。长度各为四分之一和四分之三的两个肽段又在体温下自发地松开，然后被其他蛋白水解酶裂解。

### 弹性蛋白是弹性纤维中的橡胶状蛋白质

弹性蛋白与胶原和多糖一起，存在于极大部分结缔组织中。这是弹性纤维的主要成分，它们能拉长到原长度的几倍，而张力松弛后就会很快恢复它们原来的大小和形状。在血管壁，特别是在心脏附近主动脉的弓形结构以及韧带中都有大量的弹性蛋白。食草动物颈部凸出的弹性韧带是弹性蛋白特别丰富的来源。在皮、腱和疏松结缔组织中弹性蛋白较少。

弹性蛋白的氨基酸组成是很独特的。与胶原一样，残基中有三分之一是甘氨酸。弹性蛋白中也富有脯氨酸。与胶原不同，弹性蛋白中羟基脯氨酸极少，没有羟基赖氨酸，极性氨基酸几乎也没有。弹性蛋白中很富含非极性脂肪残基，如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

成熟的弹性蛋白包含许多交联，这使它极为难溶，并难于分析。但是，弹性蛋白的一个可溶性前体，称为弹性蛋白原，曾从铜缺乏的猪中分离出来了。铜缺乏堵住了醛的生成。正如胶原中那样，生成醛对交联是很必要的。弹性蛋白原的质量约为125 kdal，它的氨基酸顺序的研究正在进行中。现在已经得出了若干有意义的结果。有些区段中很富含丙氨酸和赖氨酸残基。特别是下列两种顺序：

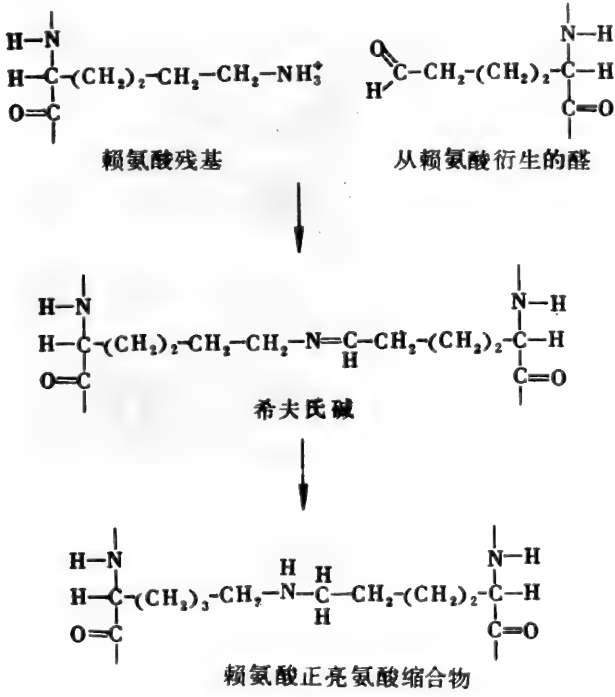
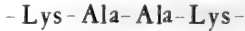


图9-23 胶原或弹性蛋白中形成的赖氨酸正亮氨酸缩合物交联。

和



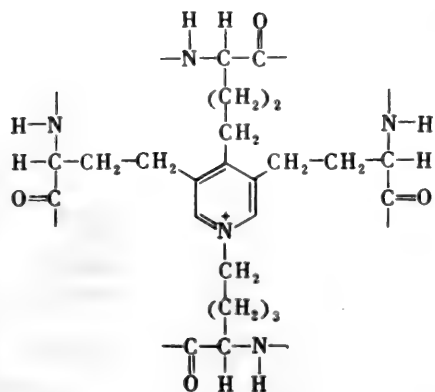
和



每个都出现了几次。在这些区段中形成了交联。胶原中找到的醛醇交联（图9-18）也存在于弹性蛋白中。从赖氨酸残基引出的另一种交联是赖氨酸正亮氨酸缩合物 (lysinon-orleucine)（图9-23），它也存在于胶原和弹性蛋白两者之中。锁链赖氨酸 (desmosine) 只存在于弹性蛋白中，从四个赖氨酸侧链中得出（图9-24）。弹性蛋白纤维之所以能在引伸后恢复到它们原来的大小和形状，这些交联起着重要作用。

弹性蛋白中交联之间的区段富





锁链赖氨酸

图9-24 锁链赖氨酸为弹性蛋白中的一种交联,是从四个赖氨酸侧链中得出的。

含甘氨酸、脯氨酸和缬氨酸。有些区段的氨基酸顺序显示规则性 (图9-25)。

这些规则区段的构象及其与弹性蛋白显著的弹性的关系,尚待阐明。关于这种蛋白功能的分子基础的详细信息,鉴于它在动脉动力学中的作用,将对阐明某些心血管疾病十分重要。

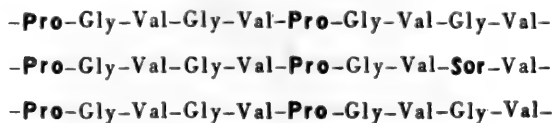


图9-25 弹性蛋白的一个可溶性前体的部分氨基酸顺序,这个顺序的重复性质很明显。

## 蛋白多糖形成结缔组织的基础物质

结缔组织也富含蛋白多糖,它由多糖(约95%)和蛋白质(约5%)单位组成。这些很大的多聚负离子与水成正离子结合,从而形成结缔组织的基础物质。蛋白多糖在决定关节和其他承受机械变形的结构的粘弹性质时很重要。氨基多糖,即蛋白多糖的多糖链是由二糖重复单位组成,后者含有葡糖胺或半乳糖胺中的一个氨基糖的衍生物。二糖中至少有一个糖带有荷负电的羧酸或硫酸基。透明质酸、硫酸软骨素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素和肝素是主要的氨基多糖(图9-26)。硫酸乙酰肝素与肝素相似,只是前者N-和O-硫酸基少一些,而

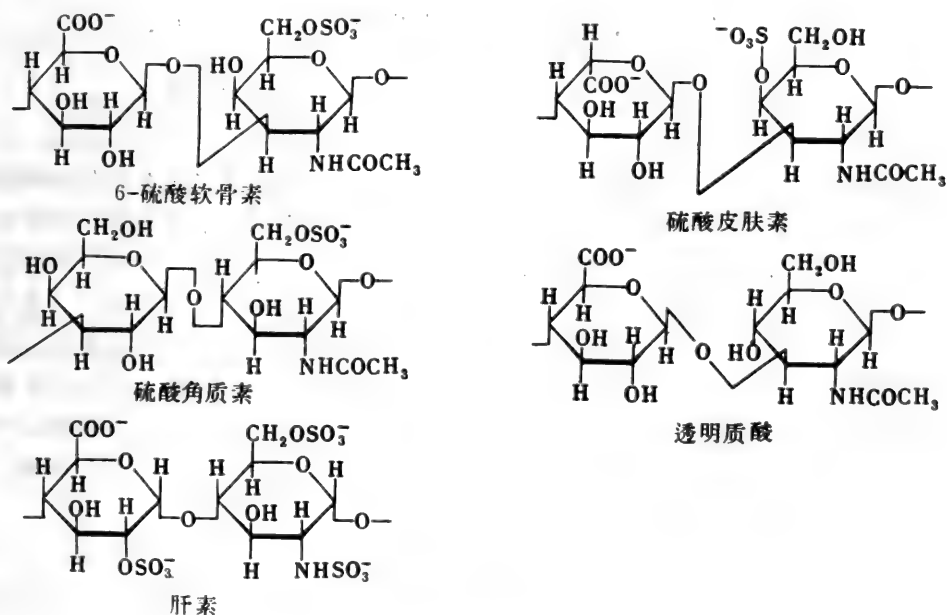


图9-26 几种主要氨基多糖中重复二糖单位的结构式。

N-乙酰基多一些。

从软骨（图9-27）得出的蛋白多糖中，硫酸角质素和硫酸软骨素是与一个多肽骨干共价

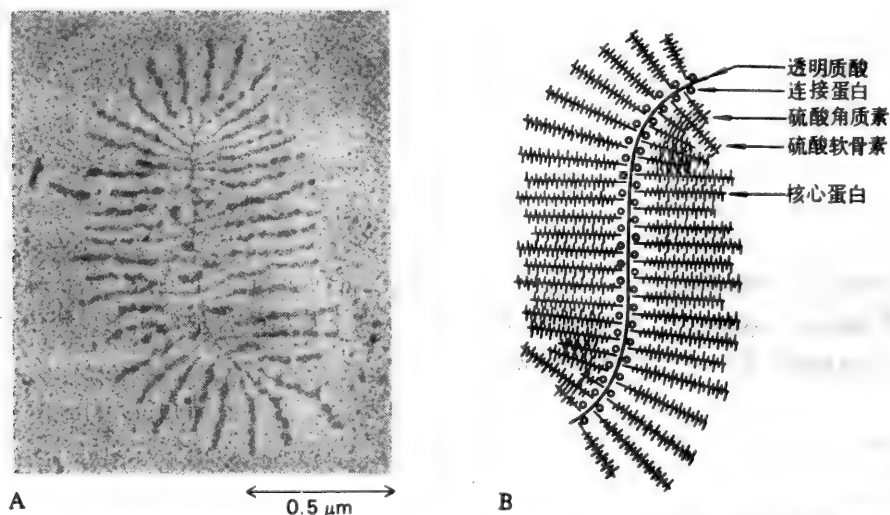


图9-27 A. 取自牛胎儿骶软骨的蛋白多糖集合体的电子显微照片。蛋白多糖单体按一定间隔交错在透明质酸长丝的两侧出现。B. 示意图。A. [蒙Dr. Joseph Buckwalter and Dr. Lawrence Rosenberg特许。] B. [依据L. Rosenberg, In *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*, M. Burleigh and R. Poo eds. (North-Holland, 1975), p. 105.]

结合在一起的，后者称为核心蛋白。这些亚基中约有140个是以 $300\text{Å}$ 的间隔，非共价地与透明质酸很长的丝结合起来的。这个相互作用为一个很小的连结蛋白所促进。整个复合体的质量为 $10^5\text{ kdal}$ 数量级，而长度为几微米。来自其他几种组织的蛋白多糖具有不同的结构。这启示我们，这一类很大的生物分子还有些至今尚未发现的功能。

## 概 要

胶原是一族具有很高抗张强度的蛋白质。它是皮、骨、腱、软骨、血管和牙齿的主要纤维成分。四类分布在不同组织中的胶原已被表征。胶原的基本结构单位是原胶原，它由三股组成，每股的长度约为1000个残基。胶原的甘氨酸和脯氨酸含量特别高。此外，胶原还含有其他蛋白中很少含有的羟基脯氨酸和羟基赖氨酸。胶原的氨基酸顺序非常独特：几乎每个第三位残基都是甘氨酸。原胶原是三股螺旋杆，长和直径各为 $3000\text{Å}$ 和 $15\text{Å}$ 。它每条链的螺旋基元是与 $\alpha$ 螺旋的完全不同。每股的甘氨酸残基的NH基与其他两股上的CO基形成氢键。胶原螺旋的稳定性也有赖于它的脯氨酸和羟基脯氨酸残基的固定效应以及羟基脯氨酸的羟基所形成的氢键。这个三股螺旋的内部是拥挤的，从而在氨基酸顺序中所有第三个残基必为甘氨酸。

蛋白水解活化在胶原的生物合成中起着重要作用。类型I原胶原的三条链是作为较大的前体合成的，它们称为 $\text{pro-}\alpha 1(\text{I})$ 和 $\text{pro-}\alpha 2$ 。溶胶原链中某些脯氨酸残基被脯氨酰羟化酶转化为羟基脯氨酸。这种羟化酶需要与 $\text{O}_2$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\alpha$ -酮戊二酸一起才能发挥出活性；象抗坏血酸这样的还原剂也是需要的。在没有抗坏血酸的情况下合成的胶原，因为羟化作用不

够,就不够稳定,并导致坏血病。赖氨酸的羟化要通过另一种酶。然后糖就会连在前体链的羟基赖氨酸残基上。这些羟基化和糖基化反应是在成纤维细胞内进行的。溶胶原被分泌到胞外介质中。这些前体上的氨端和羧端区段然后被溶胶原肽酶切除,并给出能自发地缔合为纤维的原胶原。胶原纤维的基本设计是原胶原分子错开四分之一的阵列。最后,胶原纤维还要交联后才能增添强度。例如,胶原中某些赖氨酸侧链被氧化为醛,然后缩合成醛醇交联。

弹性蛋白是结缔组织弹性纤维中一种不溶性的橡胶状蛋白,能可逆地引伸到它们原来长度的几倍。象韧带和主动脉弓形结构这样的结缔组织含有很多弹性蛋白。与胶原一样,弹性蛋白也含有大量脯氨酸和甘氨酸。与胶原不同,弹性蛋白中很少羟基脯氨酸,而根本不含羟基赖氨酸。它的氨基酸组成是高度非极性的。弹性蛋白的氨基酸顺序显示某些规则性。例如,顺序-Pro-Gly-Val-Gly-Val-经常出现。弹性蛋白合成时是一个可溶性的前体,然后按种种方式形成交联。这些交联之一的锁链赖氨酸是从四个赖氨酸残基得出的。醛中间体参与弹性蛋白中交联的形成,正如在胶原中那样。

蛋白多糖是结缔组织的另一种主要的大分子成分。它由多糖和蛋白质单体组成。多糖链称为氨基多糖,系由负电荷密度很高的二糖重复单位组成。蛋白多糖形成基础物质,在决定结缔组织的粘弹性质时是很重要的。

## 习 题

1. 多聚-L-脯氨酸是一个合成多肽。它能采纳螺旋构象,正如胶原三重螺旋中的每一股那样。
  - (a) 多聚-L-脯氨酸不能形成三重螺旋,为什么?
  - (b) poly(Gly-Pro-Pro)能形成三重螺旋,如在胶原中那样。预言poly(Gly Pro Gly)相对于poly(Gly Pro-Pro)的三重螺旋的热稳定性。
  - (c) 你愿设想poly(Gly-Pro-Gly-Pro)能象胶原那样形成三重螺旋吗?
2. 考虑氨基酸顺序  
 -Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Pro-Gly  
  - (a) 哪些残基对脯氨酰羟化酶在C-4上进行羟化是敏感的?
  - (b) 哪些肽键对来自溶组织梭菌(*clostridium histolyticum*)的胶原酶所进行的水解反应最为敏感?
3. 在前面的章节中已经讨论了蛋白质中的几种共价交联。下列蛋白质若有共价交联的话,请指明其类型。
  - (a) 核糖核酸酶
  - (b) 血红蛋白
  - (c) 血纤维蛋白
  - (d) 胶原
  - (e) 弹性蛋白
4. 脯氨酰羟化酶能在没有肽基脯氨酰基底物的情况下脱去 $\alpha$ -酮戊二酸的羧基。这个反应需要亚铁离子、 $O_2$ 和抗坏血酸。此发现对这个酶进行羟化反应的机理意味着什么?

## 第10章 生物膜引论

现在我们转向生物膜。它主要是由蛋白质和脂类组成的有机集合体。膜执行的功能对生命是必不可少的。膜使细胞与它们的环境隔离并取得个性。膜是具有高度选择性的半透性屏障，而不是不可穿透的壁，因为它们含有专一性的分子泵和门。这些运输系统调节着胞内介质的分子和离子组成。真核生物细胞也含有内膜，形成象线粒体、叶绿体和溶酶体等细胞器的界面。在演化进程中，功能的专门化是与形成这些分隔密切相联的。

膜也控制着细胞及其环境之间的信息流。它们含有对外来刺激的专一性受体。细菌向食物的运动，靶细胞对象胰岛素这样的激素的反应以及光的感受是这样一些过程的实例，其中原始事件是由膜中专一性受体来检测信号。反过来，有些膜发生化学的或电的信号。因此，膜在生物通讯中起着中心作用。

生物体系中两种最重要的能量转换过程是由含有酶和其他蛋白的高度有序阵列的膜系统执行的。光转换成化学键能的光合作用是在叶绿体（图10-2）的内膜上进行的，而燃料分子氧化成腺苷三磷酸(ATP)的氧化磷酸化作用，是在线粒

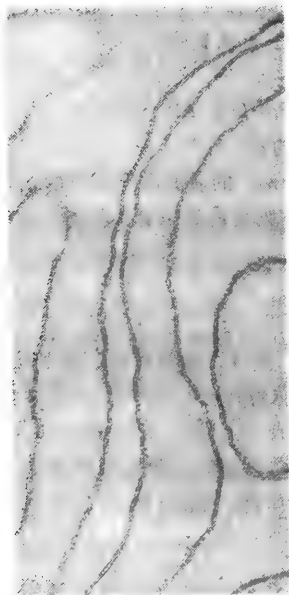


图10-1 从红血细胞制备的质膜的电镜照片。[蒙Dr. Vincent Marchesi 特许。]

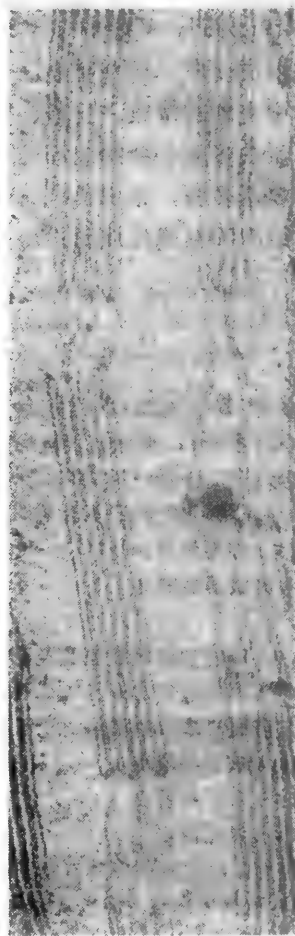


图10-2 光被叶绿体的类囊体膜中的光合作用集合体转换成化学键能。[蒙Dr. Myron Ledbetter 特许，引自 *Introduction to the Fine Structure of Plant Cells* by M.C. Ledbetter and K.R. Porter (Springer-Verlag, 1970).]

体的内膜上进行的。在后面的章节中将详细讨论这些和其他膜过程。本章涉及大多数生物膜共有的一些基本特征。

## 生物膜的共同特征

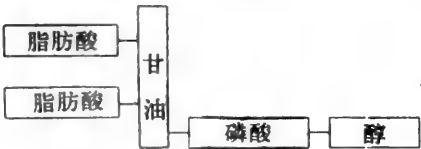
与膜的功能一样，它的结构也是多种多样的。虽然这样，它们也有一系列共同的重要属性：

1. 膜为片状结构，只有几个分子的厚度，它在不同组成的分隔之间形成闭合的界面。大多数膜的厚度介于60到100Å之间。
2. 膜主要由脂类和蛋白质组成。在大多数生物膜中蛋白质对脂类的重量比介于1：4到4：1之间。膜也包含碳水化合物，它与脂类和蛋白质连在一起。
3. 膜脂类是较小的分子，它们具有亲水和疏水的两部分。这些脂类自发地在水介质中形成闭合双分子层。这些脂类双层是极性分子流动的障碍。
4. 特定蛋白执行膜的一些独特功能。蛋白质担任泵、门、受体、能量转换器和酶。膜蛋白插入脂类双层中，后者为这些蛋白的作用创设了合适的环境。
5. 膜是非共价集合体。组成膜的蛋白质和脂类分子是靠许多非共价相互作用集在一起的，这种相互作用具有协同性质。
6. 膜是不对称的。膜的内侧和外侧面是不同的。
7. 膜为流体结构。脂类分子与蛋白质一样，除非为特定相互作用所固定，在膜的平面内扩散得很快。膜可以认为是定向的蛋白质和脂类的二维溶液。

## 磷脂是主要的膜脂类

脂类是一类生物分子，与氨基酸和蛋白质是迥然不同的。按定义，脂类是水不溶性的生物分子，并在象氯仿这样的有机溶剂中很易溶解。脂类担当各种各样的生物学作用：它们充当燃料分子，作为高度集中的能量贮存，并担任膜的组分。脂类的头两个作用将在第18章中讨论。这里，主要考虑脂类是膜的组分。膜脂类的三种主要类型为磷脂、糖脂和胆固醇。

我们从磷脂开始，因为它们在所有生物膜中都是很丰富的。磷脂系从三碳醇的甘油或从比较复杂的鞘氨醇中得出。从甘油引出的磷脂称为**磷酸甘油酯**。磷酸甘油酯由一个甘油骨架，两个脂肪酸链和一个磷酸化醇组成。



磷酸甘油酯的组分

脂肪酸的长度和不饱和程度对膜流动性关系很大。两种普通脂肪酸，软脂酸（C<sub>16</sub>，饱和）和油酸（C<sub>18</sub>，一个双键）电离形式的结构示出如图10-3。它们也被称为软脂酸根和油酸根，以便强调这个事实：它们在生理条件下都是这样电离的。各种脂肪酸的命名将在第18章中讨论。



图10-3 (A)软脂酸根( $C_{16}$ , 饱和)和(B)油酸根( $C_{18}$ , 不饱和)的空间填充模型。油酸根中的顺式双键在烃链中产生弯曲。

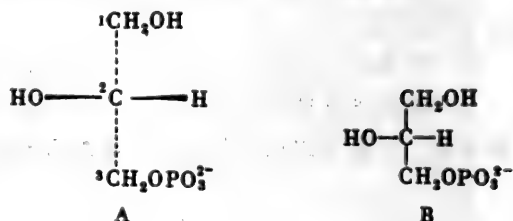
脂酰胆碱，这是广泛存在于高等生物大部分膜中的一个磷酸甘油酯。

其他重要磷酸甘油酯，如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和二磷脂酰甘油的  
结构式都在图10-5中给出。

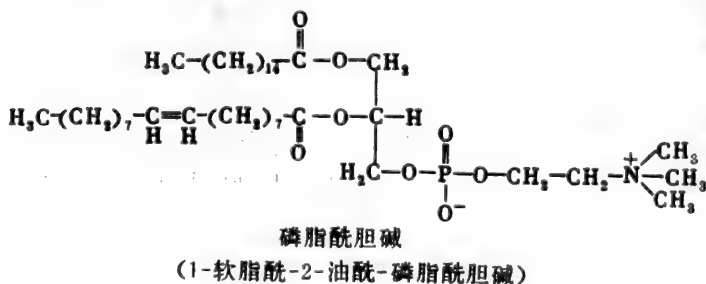
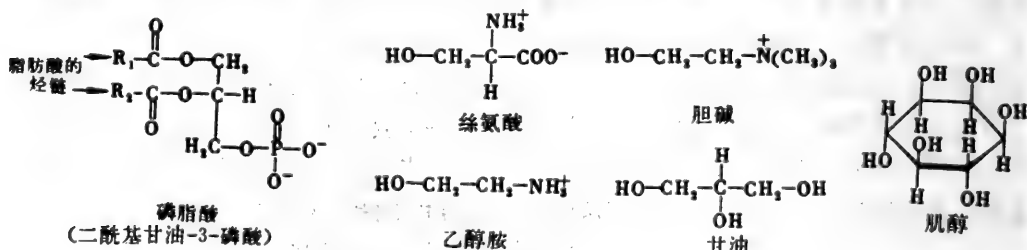
在磷酸甘油酯中，在甘油C-1和C-2处的羟基与两个脂肪酸链的羧基酯化。甘油骨干的C-3羟基则与磷酸脂化，所得化合物称为磷脂酸（或二酰基甘油-3-磷酸），是最简单的磷酸甘油酯。膜上只有少量的磷脂酸。然而，它在合成其他磷酸甘油酯时却是一个关键中间物。

主要的磷酸甘油酯是磷脂酸的衍生物。磷脂酸的磷酸根基团已与醇中的羟基酯化。磷酸甘油酯中常见的醇为丝氨酸、乙醇胺、胆碱、甘油和肌醇。现在我们要把这些组分连接成磷

图 10-4 膜脂类的甘油 3-磷酸部分的绝对构型: (A) 连在 C -2 上的 H 和 OH 是在纸面之前, 而 C -1 和 C -3 则在其后; (B) 这个结构的 Fischer 表示法。在 Fischer 投影中, 水平键代表在前方的键, 而垂直的键代表在纸面之后的键。



鞘磷脂是膜中仅有的一种不从甘油引出的磷脂。而鞘磷脂的骨干是鞘氨醇，后者是一个



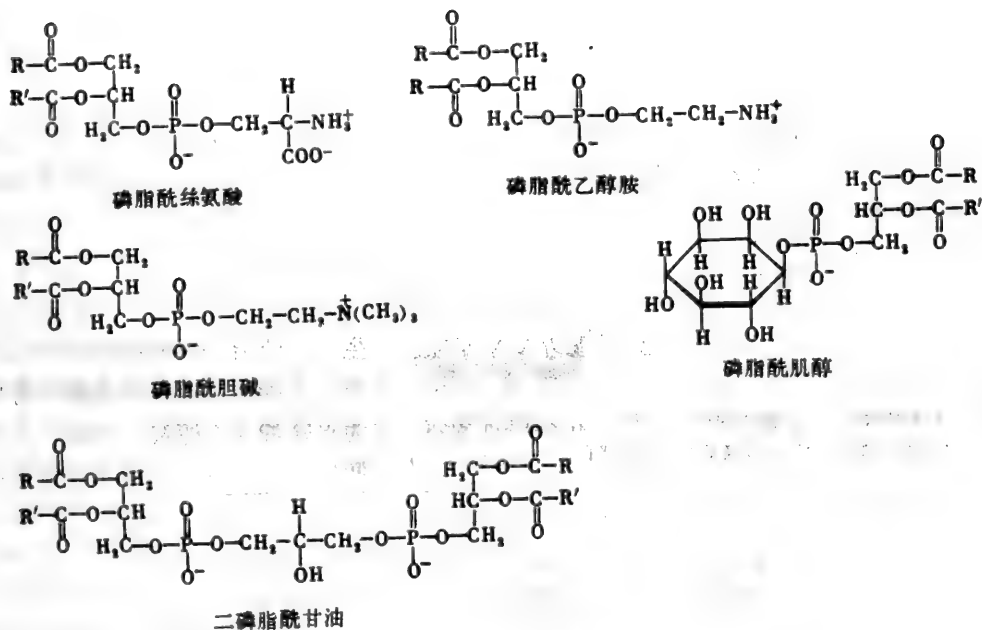
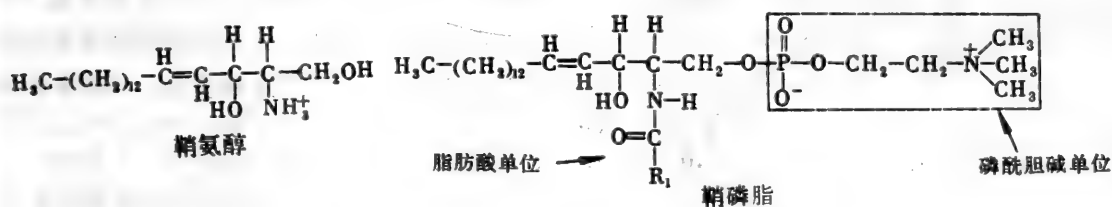


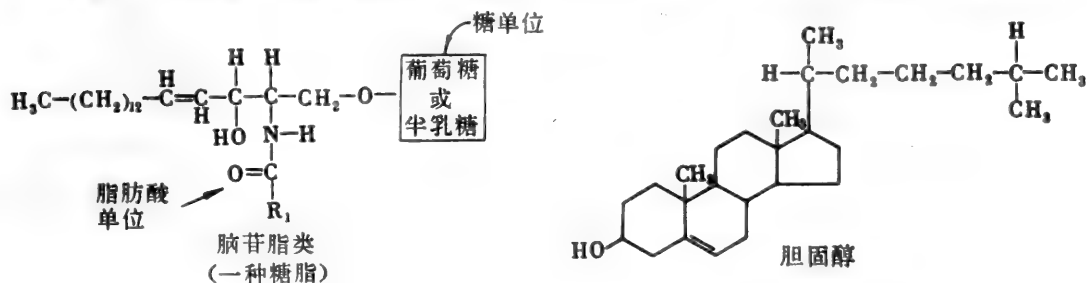
图10-5 一些磷酸甘油酯的结构式。

含有不饱和的长烃链的氨基醇。在鞘磷脂中，鞘氨醇骨干的氨基是通过一个酰胺键与脂肪酸相连的。此外，鞘氨醇的伯羟基则与磷酸胆碱酯化。不久将看到，鞘磷脂的构象很象磷脂酰胆碱。



许多膜也含有糖脂和胆固醇

糖脂，一如其名，是含糖的脂类。在动物细胞中，糖脂，与鞘磷脂相似，是从鞘氨醇中



引出的。鞘氨醇骨干的氨基，象在鞘磷脂中那样，被脂肪酸所酰化。糖脂从与鞘氨醇骨干的伯羟基连接的单位性质来说，是与鞘磷脂不同的。在糖脂中，一个或多个糖（而不是磷酸胆碱）与这个基相连。最简单的糖脂是脑苷脂类，其中只有一个糖残基，不是葡萄糖就是半乳糖。比较复杂的糖脂，如神经节苷脂，可以含有多到七个糖残基的分支链。

在有些膜中还有一个重要的脂类就是胆固醇。这种固醇存在于真核生物中，但在多数原核生物中并不存在。真核生物细胞的质膜通常富有胆固醇，而在它们的细胞器膜中这种中性脂类含量就较少。

### 磷脂类和糖脂类容易形成双层

膜脂类的门类很多。初看之下，往往会使人眼花缭乱。虽然这样，它们具有一个关键性的共同主结构：膜脂类为两性分子。它们包含亲水和疏水两个部分（表10-1）。

表 10-1 膜脂类的疏水和亲水单位

膜 脂 类	疏 水 单 位	亲 水 单 位
磷酸甘油酯	脂肪酸链	磷酸化醇
鞘磷脂	脂肪酸链和鞘氨醇的烃链	磷酸胆碱
糖脂类	脂肪酸链和鞘氨醇的烃链	一个或多个糖残基
胆固醇	O H 基以外的整个分子	在 C - 3 处的 O H 基

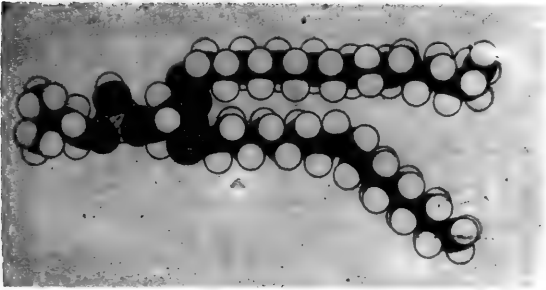


图 10-6 磷脂酰胆碱分子的空间填充模型。

我们可以看一下磷酸甘油酯，例如磷脂酰胆碱的空间填充模型（图10-6）。它的全貌有点象矩形。两个脂肪酸链互相接近于平行，而磷酸胆碱部分指向另一头。鞘磷脂具有相似的构象（图10-7）。糖脂的糖基几乎与鞘磷脂的磷酸胆碱单位占据同一位置。因此，可以采用下列简写符号来代表这些膜脂类。亲水单位，也称为极性头基团用圆代表，而烃尾则用直线或波线表示（图10-8）。

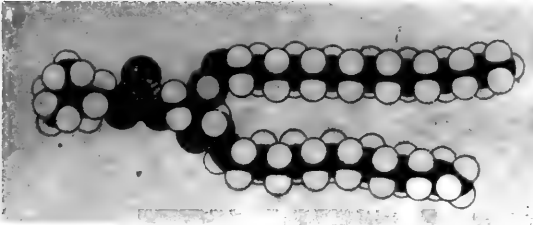


图 10-7 鞘磷脂分子的空间填充模型。



图 10-8 磷脂或糖脂分子的符号。

现在考虑磷脂和糖脂在水介质中的排列。显然，它们的极性头基团对水有亲和力，而它们的烃尾要避开水。这可以从形成胶束来实现，其中极性头基团露在表面，而烃尾则退隐到内侧（图10-9）。

另外一种能满足这些膜脂类亲水和疏水两种倾向的排列方式是一个双分子片，也称为脂类双层（图10-10）。事实上，在水介质中大多数磷脂和糖脂倾向于形成双分子片结构，而不



是胶束结构。对双层结构的倾向性在生物学中具有关键意义。一个胶束是一个很局限的结构，通常直径小于 $200\text{\AA}$ 。相反，一个双分子片能达到象一个毫米（ $10^7\text{\AA}$ ）这样宏观的尺度。磷脂和糖脂是关键的膜组分，因为它们很易形成广泛的双分子片。此外，这些片充当半透阻障，而仍然是相当流动的。

形成脂类双层是一个自动装配过程。换言之，双分子片的结构是组成它的脂类分子结构所固有的，特别是它们的两性特征。在水中从糖脂和磷脂形成脂类双层是一个迅速而自发的过程。疏水互作用是形成脂类双层的主要推动力。回想起疏水互作用在水溶液中折叠蛋白质时，也起着突出作用。当膜脂类的烃尾退隐到双层的非极性内部时，水分子就可从尾部释放出来。这样释放水将产生熵的较大增值。更有进者，烃尾之间还有范氏吸引力。这些范氏力有利于烃尾的密堆积。最后，极性头基团与水分子之间可有静电和氢键互作用。这样，脂类双层因受到全套生物体系中分子间互作用的力而趋于稳定。

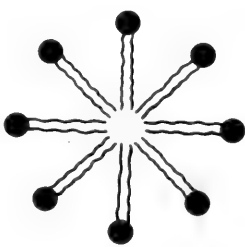


图10-9 从磷脂分子形成的胶束截面示意图。

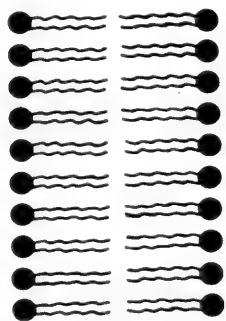


图10-10 从磷脂分子形成的双层膜截面示意图。

脂类双层是非共价的协同结构

脂类双层的另一个重要特征在于它们是协同结构。它们通过许多加强的非共价互作用合在一起。磷脂和糖脂在水中簇集在一起以减少外露的烃链的数量。一个恰当的比喻是羊在寒

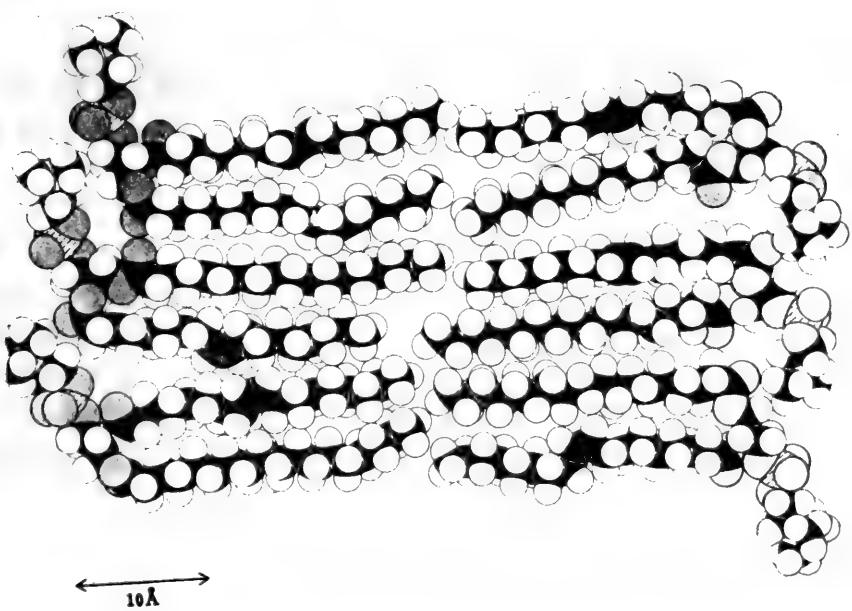


图10-11 一个流动性很高的磷脂双层膜截面的空间填充模型。

冷中簇集在一起以减少羊体外露表面的面积。相邻烃链之间的范氏吸引力也有利于簇集。这些能力学因素产生三个方面的生物学后果：(1)脂类双层具有进行扩展的内在倾向；(2)脂类双层倾向于自我闭合，以使不留露出烃尾的末端，其结果形成了分隔；(3)脂类双层是自我封闭的，因为双层中出现空隙在能量上是不利的。

### 脂类双层对离子和大多数极性分子是高度不通透的

脂类双层的可渗透性已在两个确定的合成体系上予以测量：脂泡和平面双层膜。这些模型体系是对生物膜的主要功能，即对它们作为通透屏障的作用，深入认识的源泉。关键结果在于脂类双层本能地对离子和大多数极性分子是不通透的。

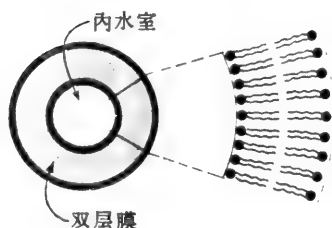


图10-12 脂泡的示意图。

脂泡(或称脂质体)是由脂类双层围成的水室(图10-12)。将适当的脂类，象磷脂酰胆碱悬浮在水介质中，就可形成脂泡。这个混合物然后通过声波作用(即用高频声波搅拌)得出一个大小均匀的闭合泡的分散体系。也可将溶解在带水乙醇中的脂类迅速混和，同样可以制备脂泡。为此，可以通过一个细针头注射脂类。这些方法制备出来的脂泡，外形几乎是球形的，直径约为 $500\text{\AA}$ 。徐徐从磷脂在混合溶剂体系中的悬浮液蒸发有机溶剂，可以制备出较大的脂泡(直径约为 $10^4\text{\AA}$ 或 $1\mu\text{m}$ )。

在离子或分子存在的情况下形成脂泡，就会将离子或分子围在脂泡的水室中(图10-13)。

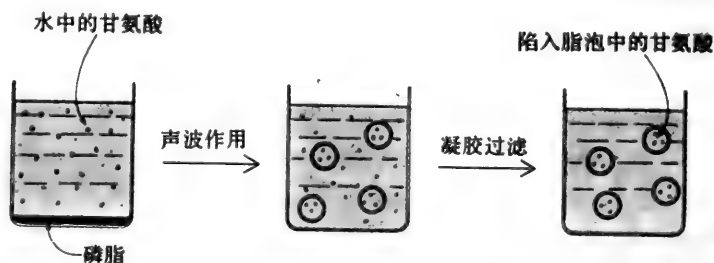


图10-13 制备含有甘氨酸分子的脂泡悬浮液。

例如，若直径为 $500\text{\AA}$ 的脂泡在 $0.1\text{ mol L}^{-1}$ 甘氨酸溶液中形成，则约有2000个甘氨酸分子陷入每个内水室中。这些包含甘氨酸的脂泡可以通过透析或凝胶过滤色谱从周围的甘氨酸溶液中分离出来。双层膜对甘氨酸的通透性可以从测量甘氨酸从脂泡内室向周围溶液散发的速度来确定。这些脂泡的价值并不只限于通透性研究。它们与许多种细胞的质膜融合，可以将一系列不通透物质引入细胞中。脂泡与特殊细胞的选择性融合，是一种控制药物送到靶细胞的很有希望的手段。

另一种定型的合成膜是平面双层膜。这个结构可借在两个水室之间隔板上横跨 $1\text{ mm}$ 小孔形成。这样的膜很适合电学研究的需要，因为它较大，而且几何学比较简单。穆勒，P. (Paul Mueller)和鲁丁，D. (Donald Rudin)示出，大双层膜很易按下面的方法形成。一个小漆刷浸入形成膜的溶液，例如磷脂酰胆碱溶在癸烷中。刷尖掠过两个水介质之间隔板上的一小孔

(直径 1 mm)。横跨小孔的脂膜自动变薄；过量的脂类在小孔边上形成隆凸。主要由磷脂酰胆碱组成的平面双层膜在几分钟内即可形成。这个宏观双层膜的导电性质，只要在每个水室中插入电极后就可予以研究(图10-14)。例如，它对离子的通透性可以通过测量穿过膜的电流与所加电压的函数来予以确定。

脂泡通透性的研究和平面双层的电导测量已经指明，脂双层膜对离子和大多数极性分子的通透性很低。对这个结论来说，水是一个突出的例外，它很容易穿过这样的膜。测得的通透性系数幅度很大(图10-15)。例如， $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 穿过这些膜要比 $\text{H}_2\text{O}$ 慢 $10^9$ 倍。色氨酸在pH 7下为一两性离子，穿过膜要比吡啶慢 $10^3$ 倍，吡啶是与色氨酸在结构上有关系的分子但没有离子基团。小分子的通透性系数是与它们在非极性溶剂中的溶解度相对于在水中的溶解度相关联的。这个关系建议，小分子可能是按下列方式通过脂双层膜的：

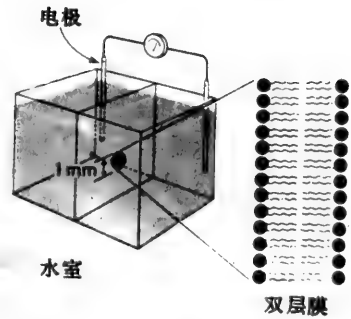


图10-14 为研究平面双层膜所作的实验安排。双层膜在分隔两个水室的隔板上横跨 1 mm 小孔形成。

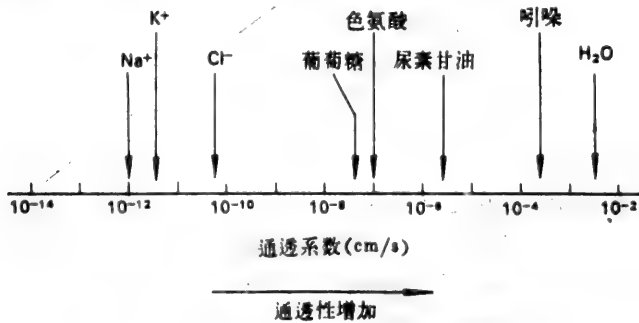


图10-15 脂双层膜中一些离子和分子的通透性系数。

第一，它脱去其水合层，然后溶入膜的碳氢核心中；最后，它在扩散中通过核心到膜的另一侧，并在那里重被水合。

## 蛋白质实现大多数膜过程

我们现在转向膜蛋白，它们承担由膜实现的极大多数动态过程。膜脂类形成通透性屏障，从而建立分隔室，而专一蛋白质则担任独特的膜功能，如运输、通讯和能量转换。膜脂类为这样的蛋白质创设了合适的环境。

多种膜的蛋白含量并不相同。髓磷脂作为某些神经纤维周围绝缘体的一种膜，蛋白含量很低(18%)。作为髓磷脂中一种主要分子的脂类是很适合绝缘之用的。相反，大多数其他细胞的质膜就要活跃得多。它们含有许多泵、门、受体和酶。这些质膜的蛋白含量典型地为50%。涉及能量转换的膜，如线粒体和叶绿体的内膜，拥有最高的蛋白含量，比较典型的是75%。

膜中主要蛋白较易用SDS-聚丙烯酰胺-凝胶电泳来检测。在这个技术中，待分析的膜先在1%的十二烷基硫酸钠(SDS)中增溶。这个去污剂解开了几乎全部蛋白-蛋白和蛋白-脂类相互作用。将一层溶液放在含有SDS的丙烯酰胺凝胶的上面，然后加上电场数小时。在没有

SDS 的情况下,许多蛋白在这个凝胶中的电泳迁移率取决于它们的质量,而不取决于它们的净电荷。与蛋白结合的SDS分子所提供的负电荷要比蛋白自身的净电荷大得多。当凝胶着上象coomassie蓝这样的染料时可以显出一个谱带来。几微克的蛋白都可用这样的方式检测出来。红细胞的质膜、视杆细胞的光受体膜和肌肉的肌浆网膜等三种膜的凝胶电泳谱示出于图10-16中。凝胶谱指出,这三种膜的蛋白组成很不相同。此外,它们的不同之处还在于多肽链种数和质量分布。简言之,执行不同功能的膜含有不同的蛋白质。

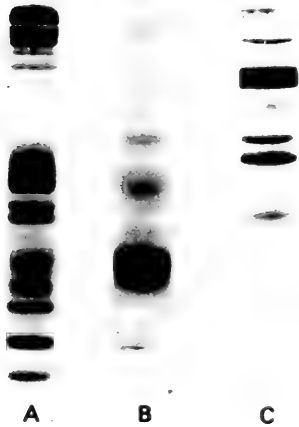
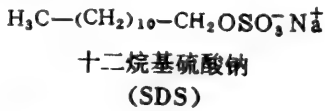


图10-16 (A)红细胞的质膜,(B)视杆细胞的圆盘膜和(C)肌肉细胞的肌浆网膜的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶谱。[蒙Dr. Theodore Steck (part A) and Dr. David MacLennan (part C) 特许。]

### 功能性膜系统能从纯化组分中重组

不少膜蛋白已经被增溶和纯化(见第34至37章)。其中有些在去污剂溶液中具有活性。例如,视紫红质为一光受体蛋白,在去污剂溶液中的500nm吸收带,与在视黄醛盘膜中的一样。此外,这个蛋白的辅基在上述两种环境中光照下发生的结构变化是相同的。钙隔绝蛋白(calsequestrin)为肌肉的肌浆网膜中一个结合钙的蛋白,它即使在移离膜的环境后仍保留这种与离子结合的性能。钙泵(称为 $\text{Ca}^{2+}$ 腺苷三磷酸酶或 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶)也已从这个膜系统中分离出来。事实上,功能活跃的泡能从磷脂和泵蛋白的混合物中形成。只要为泵提供作为能源的ATP,这些泡即能积聚 $\text{Ca}^{2+}$ 。从纯化组分来重组功能活跃的膜系统是阐明膜过程的一个很有威力的实验途径。

### 有些膜蛋白深埋在脂类双层中

有些膜蛋白,只要通过象应用高离子强度溶液(例如, $1\text{mol L}^{-1}\text{NaCl}$ )进行抽提这样比较温和的手段,就能释放出来。其他膜蛋白结合得要牢固得多,需要应用一种去污剂(图10-17)或一种有机溶剂才能分离出来。膜蛋白根据它们分离的难易可以分为周围的和本体的(图10-18)。本体的蛋白与膜脂类的烃链广泛发生互作用,从而只有通过能竞争这些非极性相互作用的试剂才能使它们从膜脱离出来。相反,周围蛋白是通过静电和氢键互作用与膜结合的,这些极性互作用通过加盐或改变pH就能被破坏。现在看来,大多数膜周围蛋白是与本体蛋白的表面相结合的。

冰冻断裂电子显微术是一个很有价值的技术,它可以确定蛋白质是否定位在生物膜的内部。细胞或膜碎片在液氮温度下很快冻结。冻结后的膜就可用切片刀把它击破。通常沿双层

中间的平面发生解离 (图10-19)。因此,脂类双层内部的广大区域得以外露。这些外露的区域然后用碳和铂造影,给出了双层内部的复制物。膜的外表面也可以通过冰冻断裂和深度消蚀技术变成可见。首先,冰冻后的膜内部在断裂后外露了。然后将覆盖在邻接的膜表面上的冰升华掉,这个过程称为深度消蚀。综合后的技术称为冰冻-消蚀电子显微术,它可以使人看到膜的内部情况以及它的内外表面。冰冻-消蚀技术的一个很有吸引力的特色是无需应用固定剂和脱水剂。

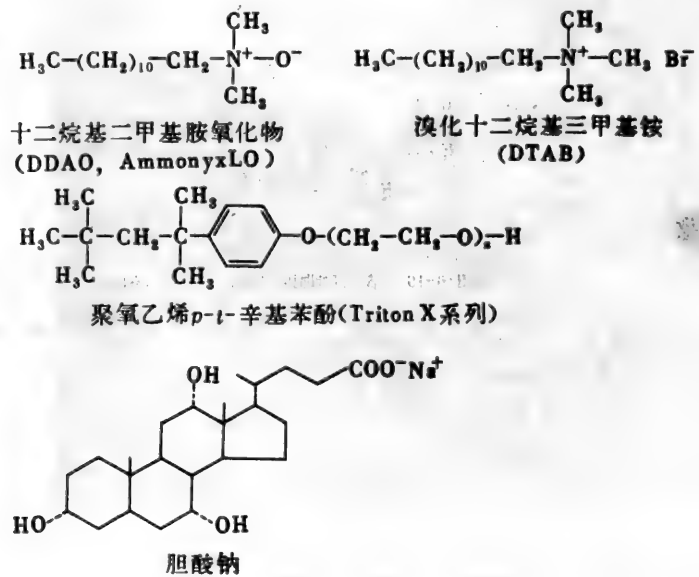


图10-17 用来增溶和纯化膜蛋白的某些去污剂的结构。

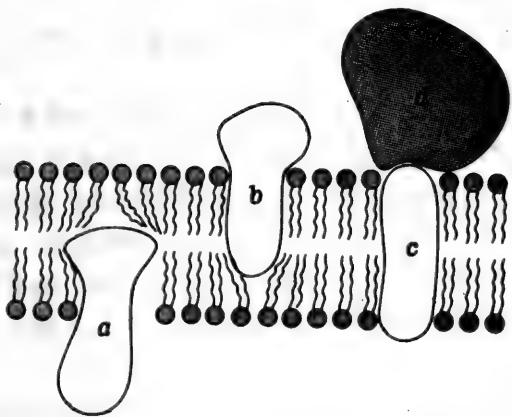


图10-18 膜本体蛋白质 (a、b、c) 与双层的烃区发生广泛的相互作用。膜周围蛋白 (d) 与膜本体蛋白的表面相结合。

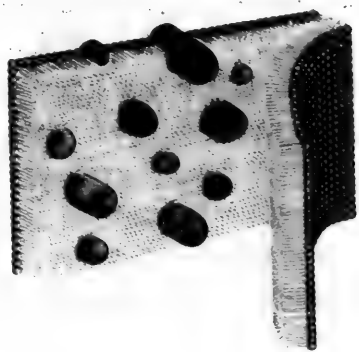


图10-19 冰冻断裂电子显微术。解理面通过双层膜中间。[依据S. J. Singer, *Hosp. Pract.* 8 (1973): 81.]

冰冻-消蚀研究已为很多生物膜中存在本体蛋白提供了直接的证据。例如,在红细胞膜内部包含一个高密度的球形颗粒,直径约为75Å (图10-20)。肌浆网膜内侧也富含球粒。相反,从磷脂酰胆碱合成的双层给出光滑的断裂面。髓磷脂膜的大面积断裂面也是光滑的。这一点不出所料,因为它主要用作绝缘体,从而相对来讲是一个无所作为的膜。

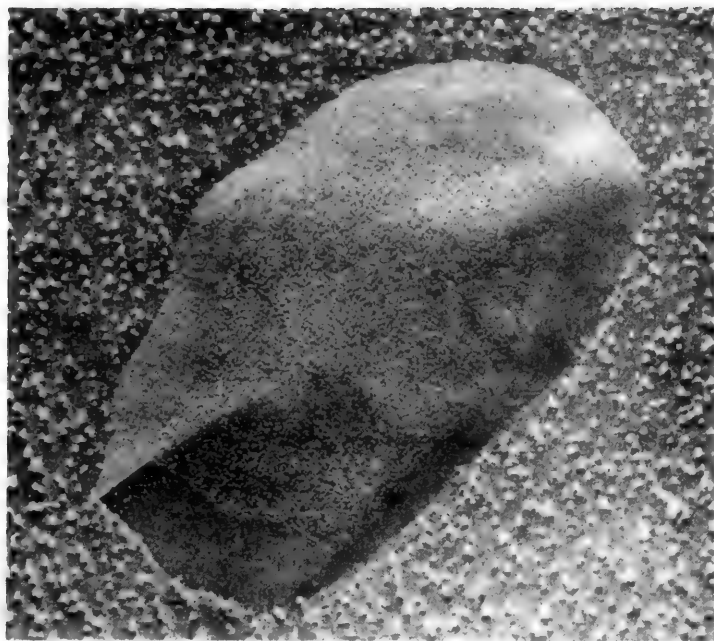


图10-20 红血细胞质膜的冰冻-消蚀电子显微镜照片。膜的内部，在膜断裂后外露，富含直径约为75Å的球粒。这些颗粒是膜本体蛋白。[蒙Dr. Vincent Marchesi特许。]

### 红细胞膜中含有各种周围蛋白和本体蛋白

红细胞在膜的研究中已被选为探索的对象，因为它们来源丰富，而且比较简单。它们没有细胞器，从而只有一种单一的膜，即质膜。这些细胞的所有细胞质内含物都可以通过渗透溶血作用脱除，然后给出残骸来，它们是相当纯的质膜。这样制备的膜的SDS-聚丙烯酰胺凝胶谱示出于图10-21中。当这个凝胶着上coomassie蓝时，有十几个谱带很明显。编号后主要的几个谱带为1,2,3,4.1,4.2,5,6和7(图10-21)。着上过碘酸(periodic acid)-希夫(Schiff)(PAS)试剂后可以显示出几个富含碳水化合物的蛋白质。这些谱带用PAS-1,PAS-2,PAS-3和PAS-4标出。

这些蛋白质是在红细胞膜中的什么位置上？相应于谱带1,2,4.1,4.2,5和6的蛋白质只要改变介质的离子强度和pH就能从膜中提取出来，从而它们是周围蛋白。此外，当完整的红细胞或密封的残骸与各种蛋白水解酶一起温育时，它们亦无变化。相反，若有漏孔的残骸用蛋白酶处理时，它们就会广泛地被消化。于是，可以得出结论，这些周围蛋白定位于红细胞膜的细胞质那一面。谱带6是甘油醛-3-磷酸脱氢酶，它是一个糖酵解酶(202页)；而谱带5为肌动蛋白，它是肌肉收缩和细胞运动中的关键蛋白(636页)。带1和2称为红膜肽(spectrin)，它们联合起来形成一个伸展的丝状网络。红膜肽与其他蛋白协作，可能稳定

和调节着红细胞膜的形状。红细胞在流经小血管时形状明显改变（图10-22）。而且，红细胞被心脏抽送时当承受很大的机械应力。

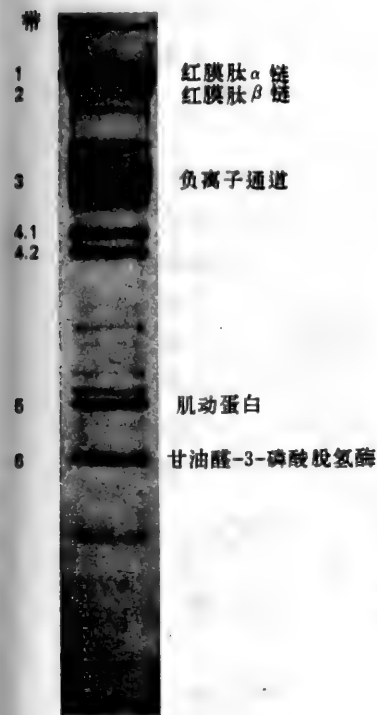


图10-21 红细胞的SDS-聚丙烯酰胺-凝胶谱。凝胶着上了coomassie蓝。  
[ 蒙Dr. Vincent Marchesi 特许。 ]



图10-22 红细胞在流经小血管时会可逆地改变形状。[引自P. I. Branemark, *Intravascular Anatomy of Blood Cells in Man* (Basel: S. Karger A G), 1971. ]

相反，谱带3和7以及所有四个PAS带，只能通过去污剂或有机溶剂才从红细胞膜上脱落下来。因此，它们是膜本体蛋白。这个推断已被冰冻-断裂电子显微术所印证（图10-20）。它示出，有些红细胞膜蛋白深埋在膜的烃区中。

### 负离子通道和血型糖蛋白贯穿红细胞膜

红细胞膜含有一个负离子通道，它使膜能被 $\text{HCO}_3^-$ 和 $\text{Cl}^-$ 通过。这些离子在膜两侧的迅速交换，对红细胞运输 $\text{CO}_2$ 来说，是很重要的。最近的研究已经表明，负离子通道是一个95kda的谱带-3蛋白的二聚体，它在红细胞膜中占蛋白含量的四分之一。带-3蛋白的位置和取向，已在用糜蛋白酶对原来的红细胞，有漏孔的残骸以及内侧翻在外面的泡进行的蛋白水解中研究过了。解理模式取决于糜蛋白酶能否接近膜的外表面、内表面或两种表面。这些实验表明，带-3蛋白定位在红细胞膜的两侧，而且这种蛋白的所有分子都指向同一方向（图10-23）。更有进者，它的碳水化合物单位定位在外表面上。带-3蛋白贯穿膜的特性，与它作为通道的功能是相适应的。

其他比较明确的贯穿红细胞膜的蛋白是血型糖蛋白A（glycophorin A），系由16个寡糖单位结合在一个单一肽链上形成的。诚然，这个糖蛋白中60%的质量是碳水化合物，从而它所取名称（从希腊字引出，意义为带着糖）也是恰当的。血型糖蛋白中碳水化合物很丰富，也是它与PAS试剂着色很深的原因。实际上，血型糖蛋白相当于PAS-1带。蛋白水解、化学



修饰和电子显微镜等的研究都表明血型糖蛋白A 中存在三个结构域：(1)包含所有碳水化合物单位的氨端区位于膜的外侧面上；(2)疏水的中区，埋在膜的烃核心中；和(3)富含极性和离子化侧链的羧端区，露在红细胞膜的内侧面上(图10-24)。虽然对血型糖蛋白的结构知道了不少，但它的功能仍然是一个谜。

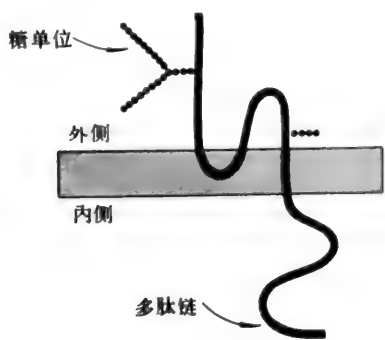


图10-23 红细胞膜中带-3蛋白(负离子通道)模型的示意图。[依据R. S. Weinstein, J. K. Khodadad, and T. L. Steck. *J. Supramol. Struct.* 8 (1978): 325.]

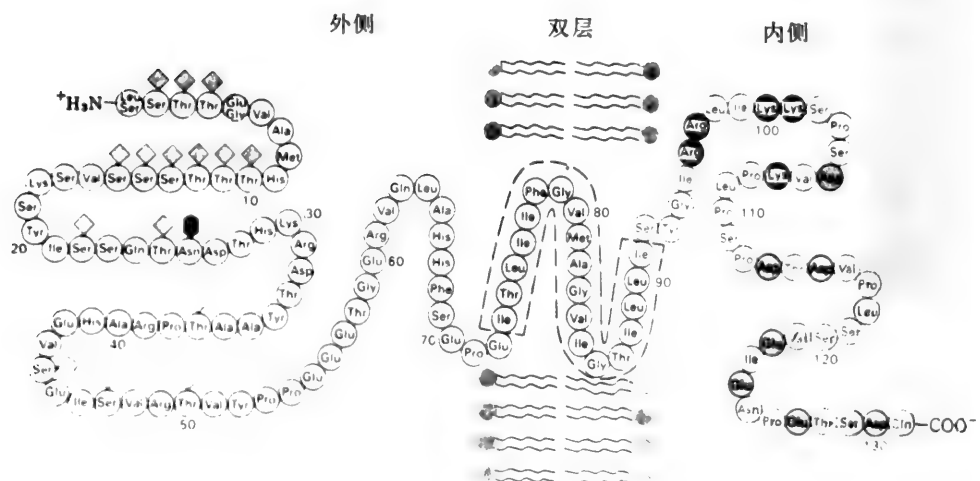


图10-24 来自红细胞膜的血型糖蛋白A 的氨基酸顺序和贯穿膜的情况。与丝氨酸或苏氨酸残基连接的十五个碳水化合物单位以方块示出，而与天冬酰胺侧链相连的以六角块示出。埋在双层中的疏水残基以虚线框示出。分子的羧端部分位于细胞内侧，富含带负电(灰色圆)和带正电(黑色圆)的残基。分子氨端部分中的碳水化合物单位露在细胞的外侧，并富含带负电的唾液酸基团。[蒙 Dr. Vincent Marchesi 特许。]

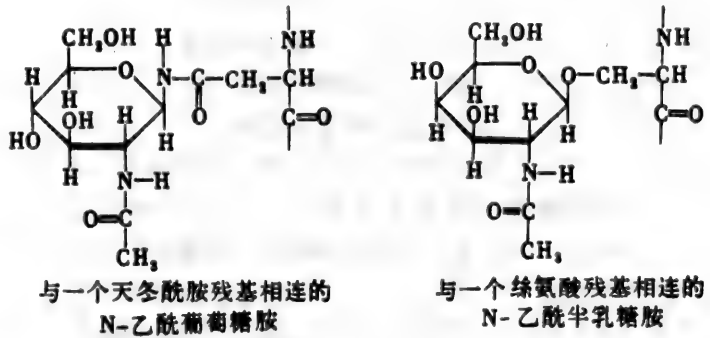
### 碳水化合物单位定位在质膜的细胞外侧

真核细胞的膜通常是2%到10%的碳水化合物，都以糖脂类和糖蛋白存在。前面已经提到(162页)，高等生物的糖脂类是带有一个或更多残基的鞘氨醇衍生物。在膜糖蛋白中，一个或更多糖残基链，通常通过N 乙酰葡萄糖胺或N 乙酰半乳糖胺与蛋白质的丝氨酸、苏氨酸或天冬酰胺侧链相连。膜中这些碳水化合物基团的位置能通过特殊的标记技术予以测定。外源凝集素(lectins)，为对特殊糖残基具有高亲和力的植物蛋白，是在这方面很有价值的



探测剂。例如,伴刀豆球蛋白A与内部的非还原性的末端 $\alpha$ -甘露糖残基相连,而麦胚凝集素则与末端N-乙酰葡萄糖胺残基相连。这些外源凝集素,如果与铁蛋白,一个带有电子很密的氢氧化铁核心的蛋白相连,很容易在电子显微照片中看到。

与铁蛋白相联的伴刀豆球蛋白A专一地与红细胞膜的外表面相连,而不与内侧的细胞质表面相连。在各种外源凝集素与多种细胞膜的结合中都观察到同样的不对称性。因此,负离子通道和血型糖蛋白的碳水化合物单位的定域化(图10-23和10-24)例



示膜结构的基本旨意:糖残基总定位在质膜的外表面。的确,在这今研究过的所有哺乳类细胞的质膜中,糖残基都毫无例外地定位在外表面上(图10-25)。

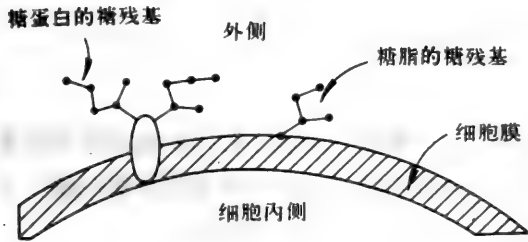


图10-25 糖蛋白和糖脂的糖残基通常定位在哺乳类质膜的外表面上。

碳水化合物基团的一个可能的作用是为膜中的糖蛋白定向。因为糖是高度亲水的,糖蛋白或糖脂的糖残基倾向于定位在膜的表面,而不在烃核心中。将寡聚糖链插到膜的烃核心中将在自由能上付出很高代价。因此,糖蛋白从膜的一侧转向另一侧要克服很高的屏障。膜糖蛋白的碳水化合物有助于维护生物膜的不对称性。

细胞表面的碳水化合物在对细胞间的识别上也很重要。不同细胞的相互作用形成一个

组织以及高等生物通过免疫系统检查外来细胞,是一些取决于细胞表面相互识别的过程的实例。碳水化合物为结构的多样性提供了可能性。出现在表面的糖可以有很多模式,因为:(1)单糖可以通过若干羟基中的任何一个互相连接,(2)C-1联结可有 $\alpha$ 或 $\beta$ 构型,和(3)广泛分支的可能性。诚然,从四种糖形成的不同寡糖,要比从四种氨基酸形成的不同寡肽,种类多得多。

### 脂类和许多膜蛋白在膜平面中扩散得很快

生物膜不是刚硬的结构。与此相反,脂类和许多膜蛋白都在不断进行着横向运动。膜蛋白的迅速运动可以通过荧光显微术观察到。人细胞和小鼠细胞在培养中可以互相融合。所得杂化细胞称为异核体。这个异核体的质膜中一部分来自小鼠细胞,另一部分则来自人细胞。那末从小鼠和人细胞得出的膜蛋白在异核体中是分开的,还是它们互相混杂在一起?为了回答这个问题可以应用荧光标记的抗体做标记物,然后用光学显微镜跟踪。一个对小鼠膜蛋白专一的抗体标记后发绿色荧光,而对人膜蛋白专一的抗体则配上发红色荧光的标

记(图10-26)。在一个刚形成的异核体中,表面的一半显示绿色荧光斑点,而另一半显示红色的荧光斑点。但在不到一个小时的时间内(在37℃下),绿色和红色荧光斑点变得完全混杂在一起了。这个实验表明,膜蛋白能在一分钟上下的时间内扩散几个微米的距离。

测量完好细胞中膜分子的横向流动性有一个更为普遍和定量的方法,即荧光光脱色复原技术(图10-27)。首先,用一个荧光生色团专一地标记细胞表面组分。通过一个荧光显微镜观察细胞表面上一个很小的区域( $\sim 3 \mu\text{m}^2$ )。然后用一个极强的激光脉冲破坏这个区域中的荧光分子。用一个强度不足以使荧光分子脱色的光来监测这个区域的荧光随时间的变化。如果标记组分是流动的话,脱了色的分子离开以及未脱色的分子进入这个光照的区域,其结果使荧光强度在消失之后又逐渐上升。荧光水平复原的速度取决于荧光标记组分的横向流动性,后者可用扩散系数 $D$ 表出。时间 $t$ (s)内在二维空间中侧向移动的平均距离 $s$ (cm)按下式取决于 $D$ ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )

$$s = (4Dt)^{1/2}$$

脂类在各类膜中的扩散系数约为 $10^{-8} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 。因此,一个磷脂分子在1秒内扩散的平均距离为 $2 \times 10^{-4} \text{cm}$ 或 $2 \mu\text{m}$ 。这意味着,一个脂类分子能在一秒内从细菌的一端移动到另一端。观察到的扩散系数的数量级表明,膜的粘度比水要大一百倍,而与橄榄油相仿。

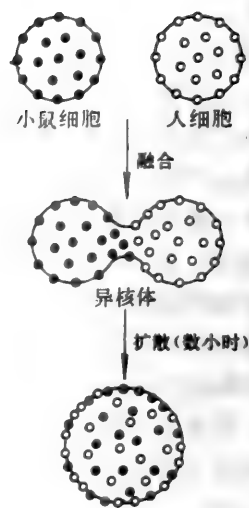


图10-26 小鼠细胞和人细胞融合,接着膜组分在质膜平面中扩散情况的示意图。几小时后,绿色和红色荧光标记物完全混杂在一起了(●代表绿色,○代表红色。)

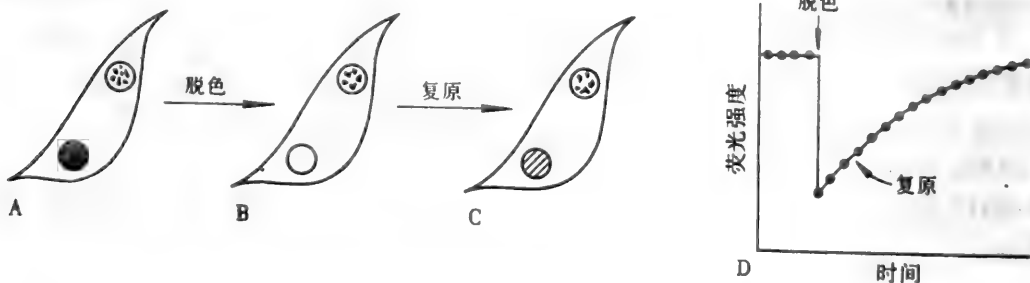


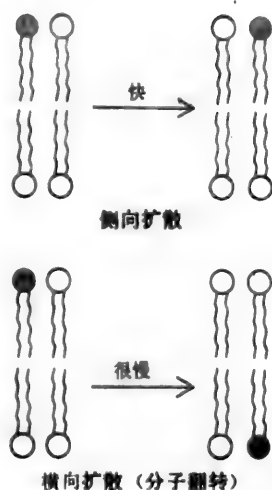
图10-27 荧光光脱色复原技术:(A)在细胞的一个很小的光照区中从标记细胞表面组分发出荧光;(B)荧光分子被强激光脉冲脱色;(C)随着脱了色的分子从光照区扩散出去,未脱色的分子逐渐扩散进来,荧光强度得到恢复;(D)复原的速率取决于扩散系数。

对比起来,蛋白质在它们的横向流动性上变化较大。有些蛋白质几乎与脂类一样流动,而其他的实际上是动不了的。例如,光受体蛋白视紫红质是一个流动性很大的蛋白,扩散系数为 $4 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 。另一个极端是纤维结合素(fibronectin),一个参与细胞-基质互作用的周围糖蛋白,扩散系数 $D$ 小于 $10^{-12} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 。有些流动性差的蛋白固定在亚膜细胞质丝上。

## 膜蛋白并不从双层的一侧转到另一侧

与脂类平行于双层平面的运动对比起来，它们从膜的一侧自发转动到另一侧的过程是一个非常缓慢的过程。分子从一个表面通过膜到另一个表面的转换称为**横向扩散**或（分子）**翻转**，而在膜的平面内的扩散称为**侧向扩散**。磷脂分子在磷脂酰胆碱泡中的翻转曾通过电子自旋共振技术直接测量过了，并得出，磷脂分子在几小时中只翻转一次（实验设计见习题5，177页）。因此，磷脂分子通过翻转穿越 $50\text{\AA}$ 膜所需的时间比侧向扩散 $50\text{\AA}$ 的时间要长 $10^9$ 倍。

蛋白质分子翻转的自由能势垒比脂类要大，因为蛋白质的极性区更为宽广。实际上，蛋白质分子的翻转从未观察到。因此，膜的不对称性，能保持得很长。



## 生物膜的流动镶嵌模型

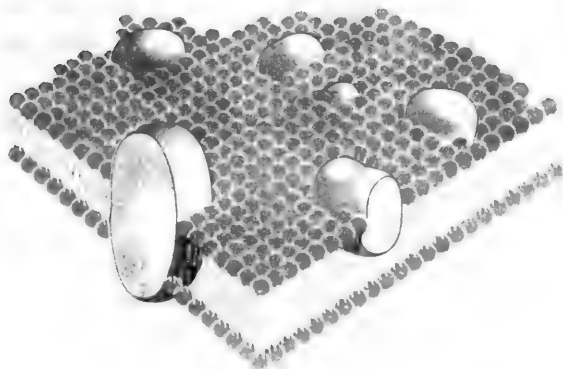


图10-28 流动镶嵌模型。[依据S. J. Singer and G. L. Nicolson. *Science* 175 (1972): 723. Copyright 1972 by the American Association for the Advancement of Science.]

1972年辛格, S. J. (S. Jonathan Singer) 和尼科尔森, G. (Garth Nicolson) 为生物膜总体组织提出一个流动镶嵌模型。他们的模型的实质在于膜是定向的球蛋白和脂类的二维溶液 (图10-28)。这个提议受到各种实验观察的支持。这个模型的主要特点为:

1. 大多数膜磷脂和糖脂分子形成双层。这个脂类双层具有双重作用: 它既对本体膜蛋白是溶剂, 也是一个通透性屏障。
2. 小部分膜脂类与特定膜蛋白发生专一互作用, 并对它们的功能是必需的。
3. 除非为特殊的互作用所限制, 膜蛋白在脂类基质中可以自由地侧向扩散, 但它们不能自由地从膜的一侧转到另一侧。

## 膜是不对称的

膜在结构和功能上都是不对称的, 正如血型糖蛋白和负离子通道的取向, 以及更一般地

象膜碳水化合物总被定位在膜外等所例示的那样。所有已知的生物膜在外部和内部表面上具有不同的组分和不同酶活性。调节细胞中 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 离子浓度的泵可以提供一简单明了的实例。

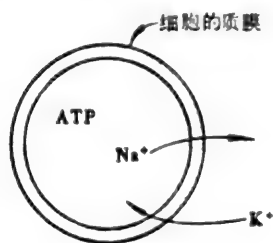


图10-29 质膜中 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 运输系统的不对称性。

这个运输系统几乎存在于较高等生物的所有细胞的质膜中。 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵定向装配在质膜中,以便从细胞中抽出 $\text{Na}^+$ ,并将 $\text{K}^+$ 吸进去(图10-29)。此外,ATP应在细胞内侧驱动着泵。乌本苷作为泵的专一抑制剂,只当它在细胞外侧时才有效。

正如将在以后的章节中(561页)详细讨论的那样,膜蛋白具有唯一取向,因为它们是按不对称的方式合成和插入的。这种绝对不对称性是通过这些蛋白质在它们存在的整个生命期间从来不作穿透膜的横向运动来保持的。脂类,由于它们生物合成的方式,也是分布得不对称的,但这种不对称

性,除非在糖脂的场合下,并不是绝对的。例如,在红细胞膜、鞘磷脂和磷脂酰胆碱倾向于定位在双层的外叶,而磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸主要在内叶。内外两叶中都有大量的胆固醇。脂类不对称性在功能上的意义还很不清楚。

### 膜流动性由脂肪酸组成和胆固醇含量控制

在双层膜中脂类分子的脂肪酰链能在有序的刚性状态或无序的流动状态中存在。在有序状态中,所有C—C键具有反位构象;而在无序状态,有些则在邻位构象中(图10-30)。

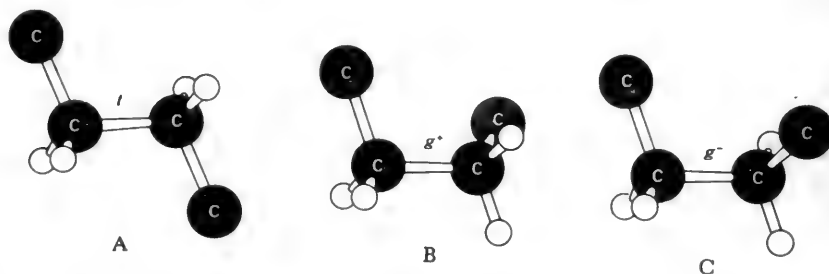


图10-30 脂肪酰链中C—C键的构象:(A)反式(*t, trans*)构象;(B和C)旋转 $120^\circ$ 给出一个邻位(*g, gauche*)构象,它可以是 $g^+$ (顺时针旋转)或 $g^-$ (逆时针旋转)。一个邻位构象使链弯曲 $120^\circ$ 。

从刚性(全反位)转化为流动(部分邻位)状态是在温度上升到溶解温度 $T_m$ 以上时发生的。这个转化温度取决于脂肪酰链的长度和它们的不饱和度。饱和的脂肪酰残基有利于刚性状态,因为它们直链烃对相互作用很有利(图10-31A)。在另一方面,顺式双键在烃链中产生弯曲。这个歪曲对脂肪酰链井然有序的堆积很有妨碍,并使 $T_m$ 下降(图10-31B),脂肪酰链的长度也影响转化温度。长烃链的相互作用要比短的强。具体而言,每增加一个 $-\text{CH}_2-$ 基,对相邻两个烃链间相互作用自由能的增值为 $-0.5\text{kcal mol}^{-1}$ 。

原核生物通过其脂肪酰链的双键数目和长度来调节它们的膜的流动性。例如,当生长温度从 $42^\circ\text{C}$ 降到 $27^\circ\text{C}$ 时,在大肠杆菌膜中饱和和不饱和脂酰链之比,从1.6减为1.0。饱和残基比例

的下降可以防止膜在温度较低时变得过于刚硬。在真核生物中,胆固醇也是膜流动性的关键调节剂。胆固醇的掺入可以防止脂酰链的晶化。实际上,胆固醇消除相变。胆固醇的一个相反的效应是在空间上堵住脂酰链的较大运动,并使膜的流动性降低。因此,胆固醇使膜的流动性适中。

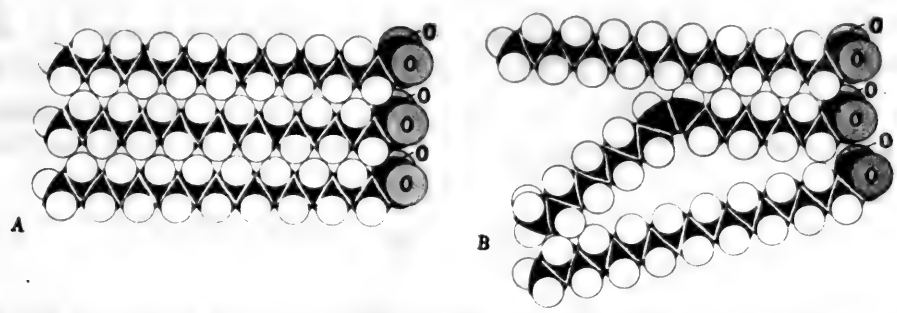


图10-31 脂肪酸链的高度有序堆积被顺式双键所破坏。这些空间填充模型示出(A)三个硬脂酸(C<sub>18</sub>, 饱和)分子和(B)两个硬脂酸分子之间一个油酸(C<sub>18</sub>, 不饱和)分子的堆积。

### 电子显微照片中可以重建膜的三维象

x射线晶体学在揭示可溶性蛋白的三维结构中的威力已经明确地建立起来了,正如前面几章中讨论的氧载体和酶所例示的那样。那末,膜蛋白的x射线晶体学分析又怎样呢?困难在于膜本体蛋白的三维晶体迄今没有得到。但是,有些膜蛋白在膜的平面内产生有序点阵结构。换言之,它们形成二维晶体。这些晶体片宜于应用电子显微术来分析结构,正如喜盐的盐生盐杆菌(*Halobacterium Halobium*)的紫膜所例示的那样。细胞膜的这个特殊区域包含细菌视紫红质。这个25kda的蛋白质能将光转化为贯穿膜的质子梯度,后者用来合成ATP (344页)。所得晶态片的直径可以达到1 μm。能使大约20,000个细菌视紫红质分子在晶态阵列中之重要意义在于应用一个很低的电子剂量就可得出一个象来,而不致产生辐射损伤。

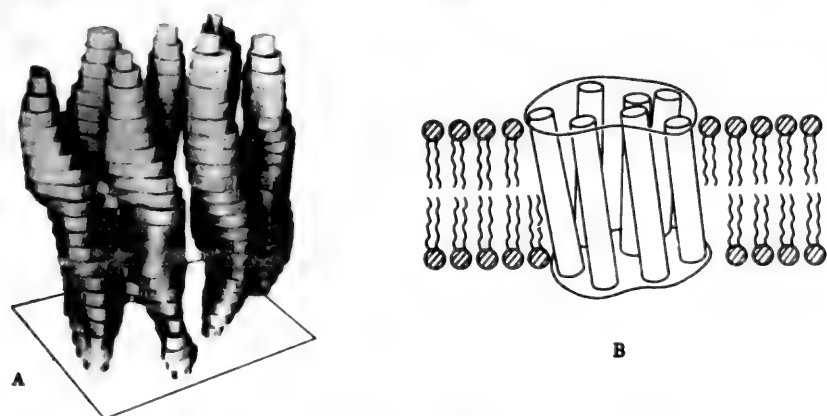


图10-32 A. 从7 Å 三维图中重建的细菌视紫红质模型。B. 表明α螺旋段在脂类双层中排列的说明图。这些螺旋之间的连结并未示出。[蒙Dr. Richard Henderson and Dr. Nigel Unwin 特许。]

此外，未沾污的样品可以在分析中得出一个高分辨率的象。紫膜晶态片的一张单一的电子显微照片给出结构在一个平面上的投影。下一个阶段是样品倾斜，并把从二十多张电子显微照片所得的信息通过富氏技术来重组。

应用这个技术，亨德森，R. (Richard Henderson) 和昂温，N. (Nigel Unwin) 重组了紫膜在 7 Å 的分辨率下的三维象 (图 10-32)。这个膜中的蛋白质包含七个堆积较密的  $\alpha$  螺旋，它们几乎在与膜平面垂直的方向上贯穿了膜的 45 Å 的厚度。脂类双层区充填在蛋白质分子之间的空间中。紫膜示出的一种结构基元，可能也代表其他膜本体蛋白。特别显得可能的是其他膜的泵和通道也将具有穿越双层的  $\alpha$  螺旋段。

## 概 要

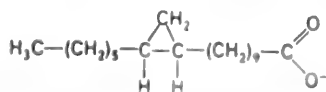
生物膜是片状结构，通常宽 75 Å，系由蛋白质和脂类分子通过非共价互作用结合而成。膜为选择性很强的通透性屏障。它们创设封闭的分隔或室，后者可以是一个完整的细胞或细胞内部的一个细胞器。膜中的泵和门调节这些室中的分子和离子的组成。膜也控制细胞间的信息流。例如，某些膜包含象胰岛素这样的激素的受体。此外，膜与象光合作用和氧化磷酸化作用这样的能量转换过程是密切相联的。

膜脂类的主要类型为磷脂、糖脂和胆固醇。作为一类磷脂的磷酸甘油酯，系由作为骨干的甘油、两个脂肪链和一个磷酸化醇组成。脂肪酸链通常含有 14 到 24 个碳原子，它们可以是饱和或不饱和的。磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺是主要的磷酸甘油酯。鞘磷脂是另一类磷脂，它所含的骨干为鞘氨醇，而不是甘油。糖脂是从鞘氨醇引出的含糖脂类。这些膜脂类的一个共同特点在于它们都是两性分子。它们在水溶液中自发地生成广泛的双分子片，因为它们包含亲水和疏水两个部分。这些脂双层对离子和大多数极性分子是高度不通透的，而它们的流动性相当好，从而对膜蛋白可以起溶剂的作用。

象运输、通讯和能量转换这样的独特功能都是由特定的蛋白质担当的。有些膜蛋白深埋在脂双层的烃区中。象来自红细胞的带-3 蛋白这样的越膜蛋白能担任离子通道。膜在结构和功能上都是不对称的：膜中离子运输系统的定向性以及糖残基都定位于哺乳类质膜的外表面上都是例证。膜是动态结构，其中蛋白质和脂类在膜的平面中扩散（侧向扩散）得很好，只要没有特殊的互作用限制它们。对比之下，蛋白质和脂类从膜的一侧转向另外一侧（横向扩散或分子翻转），通常是很慢的。膜的流动程度部分地取决于链的长度以及脂肪酸不饱和的程度。

## 习 题

1. 在磷脂双层膜的  $1\mu\text{m}^2$  区域内有多少个磷脂类分子？假设每个磷脂类分子占据  $70\text{\AA}^2$  的面积。
2. 细菌磷脂类包含环丙烷脂肪酸残基：



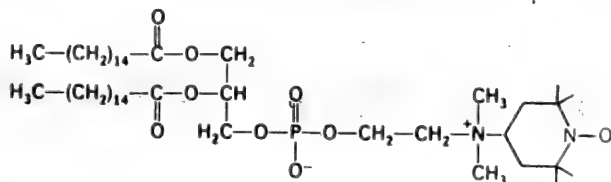
推测环丙烷环对双层内部烃链的堆积有何效应。这些环丙烷脂肪酸基团会不会影响膜的流动性？

3. 膜脂类分子在  $1\mu\text{s}$ ,  $1\text{ms}$  和  $1\text{s}$  中侧向移动的平均距离是多少? 假设扩散系数为  $10^{-8}\text{cm}^2/\text{s}$ 。
4. 一个刚性球形分子的扩散系数  $D$  可以写成

$$D = kT / (6\pi\eta r)$$

其中  $\eta$  是溶剂的粘度,  $r$  是球的半径,  $k$  是 Boltzman 常数 ( $1.38 \times 10^{-16}\text{erg/deg}$ ), 和  $T$  是绝对温度。一个  $100\text{kDa}$  的蛋白质在有效粘度为  $1\text{P}$  ( $1\text{P} = 0.1\text{Pa}\cdot\text{s}$ )<sup>\*</sup> 的膜中在  $37^\circ\text{C}$  下的扩散系数有多大? 这个蛋白质在  $1\mu\text{s}$ ,  $1\text{ms}$  和  $1\text{s}$  中侧向移动的平均距离是多少? 假设这个蛋白质是一个密度为  $1.35\text{g/cm}^3$  的非水合刚性球。

5. 科恩伯格, R. D. (R. D. Kornberg) 和麦康内尔, H. M. (H. M. McConnell) (1971) 应用磷脂酰胆碱的顺磁类似物, 称为自旋标记的磷脂酰胆碱来研究磷脂在双层中的横向扩散 (分子翻转)。



自旋标记的磷脂酰胆碱中的亚硝基给出一个独特的顺磁共振谱。当亚硝基被抗坏血酸这样的还原剂转化为胺时, 这个谱就会消失。

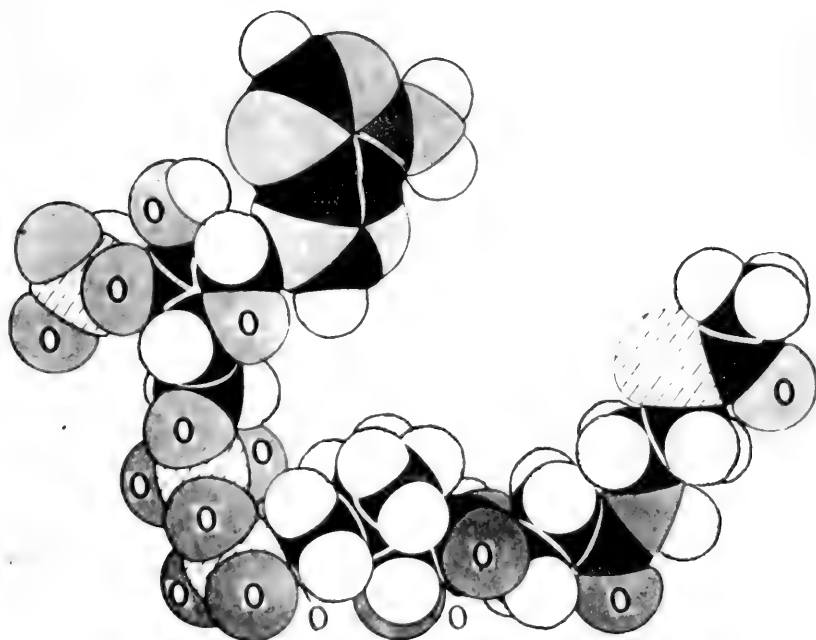
含有磷脂酰胆碱 (95%) 和自旋标记的类似物 (5%) 的脂泡靠声波作用予以制备, 并用凝胶过滤色谱纯化。这些脂质体的外径约为  $250\text{\AA}$ 。加入抗坏血酸后几分钟内顺磁共振谱的振幅降到起始值的 35%。加入第二份抗坏血酸后, 谱在几分钟内并无可以觉察的变化。但是, 残余谱的振幅按半寿期为 6.5 小时发生指数衰减。你将怎样解释顺磁共振谱振幅的这些变化?

\* 从原著单位  $\text{erg}$  改为国际单位制单位  $\text{Pa}$ ——编辑注。

## 第二篇

# 代谢能量的产生和贮藏

(吴相钰 译)



乙酰辅酶A模型，乙酰辅酶A是代谢能量产生中的一个关键中间产物。



## 第11章 代谢：基本概念和设计

已有第一篇中所发挥的构象和动力学的概念——特别是有关酶的专一性和催化能力、其催化活性的调节以及由于膜而发生区域化的概念——我们现在可以转来讨论生物化学中的两个重要问题了：

1. 细胞如何从其环境中摄取能量和还原能力？

2. 细胞如何合成其大分子的构造单元？这些过程是由许多高度整合的相互交织的化学反应来完成的，这些反应总称为代谢。

即使在像大肠杆菌这样的简单生物体内，也至少有成千种化学反应。乍看起来，存在这么多反应似乎使人迷惑不解。可是仔细一研究就会明白，代谢的设计是很紧凑的，其中有许多共同之点。代谢中反应的数目很多，但是反应的类型却较少。这些反应的机理通常是十分简单的。例如，双键通常是由脱水作用而形成。其次，有一组为数约 100 的分子在所有各种生命形式中起着中心作用。还有，代谢途径是以共同的方式被调节的。本章的目的是介绍代谢的某些普通原理和特点。

### 自由能是生物化学中最有用的热力学函数

让我们先复述一些热力学的相互关系，这是理解代谢所必需的。热力学中的体系是在一限定范围内的物质。宇宙的其余部分的物质则称为环境。热力学第一定律说的是一体系及其周围环境的总能量是一常数。换言之，能量是守恒的。第一定律的数学表达式为：

$$\Delta E = E_B - E_A = Q - W \quad (1)$$

式中  $E_A$  是在一过程开始时体系的能量， $E_B$  为过程终了时的能量， $Q$  为体系所吸收的热量， $W$  为体系所作的功。方程式 (1) 的重要特征是体系的能量变化仅决定于初始的和最终的状态而与转变的途径无关。

热力学第一定律不能用来预测反应能否自发进行。有些反应，虽然  $\Delta E$  是正的，但却能自发进行。在这种情况下，体系从其周围环境吸收热量，所以体系及其环境的能量之和不变。显然，还需要一种不同于  $\Delta E$  的函数。一个这样的函数就是熵 ( $S$ )，它是体系随机性或无序性程度的度量。当一体系变得更为无序时，其熵增加 ( $\Delta S$  为正)。热力学第二定律说的是只有当体系及其周围的熵之和增加时，过程才能自发地进行。对于自发过程

$$(\Delta S_{\text{体系}} + \Delta S_{\text{环境}}) > 0 \quad (2)$$

注意，只要环境的熵增加，因而体系的熵与环境的熵之和为正值时，在自发过程中体系的熵可能减小。例如，高度有序的生物学结构的形成在热力学上是可能的，因为这种体系的熵的减少被周围环境的熵的增加所补偿而有余。

利用熵作为指标来确定一生化过程能否自发进行时有一个困难，即化学反应的熵的变化不易测量。其次，方程式 (2) 中所给的自发性的指标要求环境与所研究的体系两者的熵变化均为已知。利用另一种称为自由能的热力学函数就可克服这些困难，自由能的符号为  $G$  (或

$F$ , 见于旧的文献中)。1878年, 吉布斯, J.W. (Josiah Willard Gibbs) 把热力学第一和第二定律结合起来, 提出了自由能这一函数。基本方程式为:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

式中  $\Delta G$  为在恒压 ( $P$ ) 和恒温 ( $T$ ) 下发生变化的体系的自由能的变化,  $\Delta H$  为此体系焓的变化,  $\Delta S$  则为此体系熵的变化。注意环境的性质并不在此方程式之内。焓的变化如下式:

$$\Delta H = \Delta E + P \Delta V \quad (4)$$

对于几乎所有的生化反应而言, 体积的变化  $\Delta V$  很小, 所以  $\Delta H$  几乎等于  $\Delta E$ , 因此,

$$\Delta G \cong \Delta E - T \Delta S \quad (5)$$

这样, 反应的  $\Delta G$  既决定于体系内能的变化, 也决定于其熵的变化。

与反应的内能变化 ( $\Delta E$ ) 不同, 反应的自由能变化 ( $\Delta G$ ) 是它能否自发进行的重要标准。

1. 只有当  $\Delta G$  为负时, 反应才能自发进行。
2. 若  $\Delta G$  为零, 则体系处于平衡, 不能发生净变化。

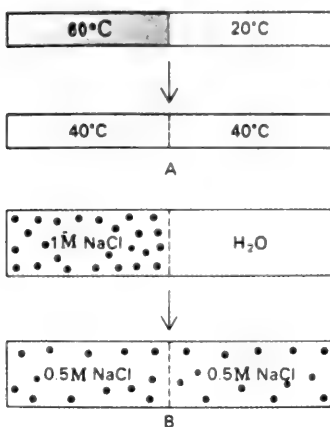


图11-1 由体系的熵增加所推动的过程举例:  
(A) 热的扩散; (B) 溶质的扩散。(M = mol L<sup>-1</sup>——编辑注)

3. 若  $\Delta G$  为正, 则反应不能自发进行, 需要输入自由能以推动这样的反应。

在此还要着重指出另外两点。第一, 反应的  $\Delta G$  仅决定于产物 (最终状态) 的自由能减去反应物 (初始状态) 的自由能。反应的  $\Delta G$  与变化的途径无关。反应的机理对  $\Delta G$  无影响。例如, 葡萄糖氧化为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  的反应, 不管它是在体外通过燃烧而发生的, 还是在细胞内通过一系列酶所催化的步骤而发生的,  $\Delta G$  都相同。第二,  $\Delta G$  完全不说明反应的速率如何。负的  $\Delta G$  表明反应能够自发进行, 但并不表示反应会以可察觉的速率进行。如前所述 (81 页), 反应速率决定于活化的自由能 ( $\Delta G^\ddagger$ ), 它与  $\Delta G$  无关。

## 反应的标准自由能变化及其与平衡常数的关系

### 考虑反应



此反应的  $\Delta G$  为:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \log_e \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (6)$$

式中  $\Delta G^\circ$  为标准自由能变化,  $R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度,  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$ ,  $[D]$  为反应物的摩尔浓度 (更严格地说, 应为活度)。 $\Delta G^\circ$  为在标准状况下 (也就是当反应物 A, B, C, D 的浓度均为 1.0 mol/L 时) 这一反应的自由能变化。因此, 反应的  $\Delta G$  决定于反应物的性质 (以方程式 6 中的  $\Delta G^\circ$  项表示) 和它们的浓度 (以方程式 6 中的对数项表示)。

对于生化反应, 常用一种惯用的方法来简化自由能的计算。标准状况被定义为如具有 pH 为 7。自然, 方程式 6 和 9 中相当于 pH 7 的  $\text{H}^+$  活度之值为 1。还有, 在这些方程式中水的活度

取 1。pH 7 下的标准自由能变化以  $\Delta G^{\circ'}$  这一符号表示，在本书中将一直使用这一符号。用千卡作为能量单位。

很易推导出反应的标准自由能与平衡常数之间的关系。平衡时， $\Delta G = 0$ 。于是方程式 6 变成

$$0 = \Delta G^{\circ'} + RT \log_e \frac{[C][D]}{[A][B]} \tag{7}$$

因此 
$$\Delta G^{\circ'} = -RT \log_e \frac{[C][D]}{[A][B]} \tag{8}$$

标准状况下的平衡常数  $K'_{eq}$  的定义为

$$K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]} \tag{9}$$

将方程式 9 代入方程式 8，则得

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \log_e K'_{eq} \tag{10}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -2.303RT \log_{10} K'_{eq} \tag{11}$$

整理此式即得

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{\circ'} / (2.303RT)} \tag{12}$$

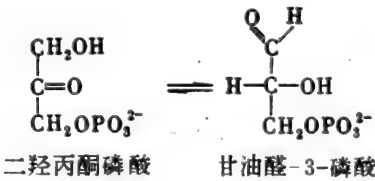
将  $R = 1.98 \times 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  和  $T = 298^\circ \text{K}$ （相当于  $25^\circ \text{C}$ ）并以  $\text{kcal/mol}$  表示  $\Delta G^{\circ'}$ ，则

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{\circ'} / 1.36} \tag{13}$$

这样，就可用一简单关系式表示反应的标准自由能与平衡常数的关系。例如，平衡常数 10 相当于  $25^\circ \text{C}$  下标准自由能变化为  $-1.36 \text{ kcal/mol}$ （表 11-1）。

表 11-1  $\Delta G^{\circ'}$  与  $K'_{eq}$  ( $25^\circ \text{C}$  下) 之间的关系 让我们以二羟丙酮磷酸异构化为甘油醛-3-磷酸为例，计算  $\Delta G^{\circ'}$  和  $\Delta G$ 。此反应在糖酵解

$K'_{eq}$	$\Delta G^{\circ'} (\text{kcal/mol})$
$10^{-5}$	6.82
$10^{-4}$	5.46
$10^{-3}$	4.09
$10^{-2}$	2.73
$10^{-1}$	1.36
1	0
10	-1.36
$10^2$	-2.73
$10^3$	-4.09
$10^4$	-5.46
$10^5$	-6.82



中发生（194 页）。平衡时，在  $25^\circ \text{C}$  ( $298^\circ \text{K}$ ) 和 pH 7 下甘油醛-3-磷酸与二羟丙酮磷酸之比为 0.0475。因此， $K'_{eq} = 0.0475$ 。于是这一反应的标准自由能变化可用方程式 11 计算：

$$\begin{aligned} \Delta G^{\circ'} &= -2.303RT \log_{10} K'_{eq} \\ &= -2.303 \times 1.98 \times 10^{-3} \times 298 \times \log_{10} (0.0475) \\ &= +1.8 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

• 能量的单位——卡 (cal) 等于使 1 克水的温度从  $14.5^\circ \text{C}$  升到  $15.5^\circ \text{C}$  所需的热量。千卡 (kcal) 等于 1000 卡。  
 焦耳 (J) 为施加 1 牛顿的力于 1 米的距离所需的能量。千焦耳 (kJ) 等于 1000 焦耳。  
 $1 \text{ kcal} = 4.184 \text{ kJ}$

现在让我们计算当二羟丙酮磷酸的初始浓度为  $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  和甘油醛-3-磷酸的初始浓度为  $3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  时, 此反应的  $\Delta G$ 。将这些数值代入方程式 6, 则

$$\begin{aligned}\Delta G &= 1.8 \text{ kcal/mol} + 2.303RT \log_{10} \frac{3 \times 10^{-6} \text{ M}}{2 \times 10^{-4} \text{ M}} \\ &= 1.8 \text{ kcal/mol} - 2.5 \text{ kcal/mol} \\ &= -0.7 \text{ kcal/mol}\end{aligned}$$

$\Delta G$  的这一负值表明当二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸的浓度如上所述时, 前者异构化为后者的反应可自发进行。注意此反应的  $\Delta G$  为负, 虽然  $\Delta G^{\circ'}$  为正。重要的是强调这一点, 即反应的  $\Delta G$  究竟是大于、小于还是等于  $\Delta G^{\circ'}$ , 这决定于反应物的浓度。反应的自发性以  $\Delta G$  为准, 而不以  $\Delta G^{\circ'}$  为准。

热力学上一个不利的反应可由一有利的反应推动

一项重要的热力学事实是, 一系列反应的总的自由能变化等于各个步骤自由能变化的总和。考虑以下反应:



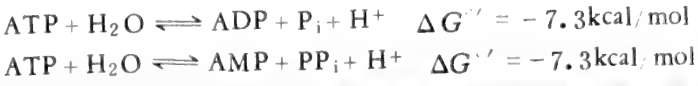
在标准状况下, A 不能自发地转变为 B 和 C, 因为  $\Delta G$  是正值。可是在标准状况下 B 转变成 D 在热力学上是有利的。由于自由能的变化是可以相加的, A 转变成 C 和 D 的  $\Delta G^{\circ'}$  为  $-3 \text{ kcal/mol}$ , 这就是说在标准状况下此反应能够自发进行。所以, 热力学上一个不利的反应可以被热力学上一个有利的反应所推动。这些反应是由共同的中间产物 B 偶联起来的。我们将会遇到代谢中能量偶联的许多例子。

## ATP 是生物体系中自由能的通用货币

活的生物需要继续不断地输入自由能, 其主要目的有三: 在肌肉收缩和其它细胞运动中作机械功, 分子和离子的主动转运以及由简单的前体合成大分子和其它生物分子。用于这些过程的自由能来自于环境, 而这些过程则使得生物体保持在远离平衡的状态。化能营养生物 (chemotrophs) 从食物的氧化作用获得能量, 光能营养生物 (phototrophs) 则通过捕获光能而获得能量。来自于食物的氧化或光的能量有一部分先变成一种特殊的形式, 而后再用于运动、主动转运和生物合成。这种特殊的自由能载体就是腺苷三磷酸 (ATP)。ATP 在生物体系的能量交换中起核心作用是由李普曼, F. (Fritz Lipmann) 和由卡尔克尔, H. (Herman Kalckar) 于 1941 年认识到的。

ATP 是由一个腺嘌呤、一个核糖和一个三磷酸单位组成的核苷酸 (图 11-2; 关于核苷酸命名法的讨论见 394 页)。ATP 的活化形式通常是 ATP 与  $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$  的复合物。为了研究 ATP 作为能量载体的作用, 我们可集中注意其三磷酸的部分。ATP 是高能分子, 因为其三磷酸单位含有两个磷酸酐键。当 ATP 水解为腺苷二磷酸 (ADP) 和正磷酸 ( $\text{P}_i$ ) 时或 ATP 水解为腺苷一磷酸 (AMP) 和焦磷酸 ( $\text{PP}_i$ ) 时, 有大量的自由能释放出来。这些反应的  $\Delta G^{\circ'}$  决定

于介质的离子强度和  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  的浓度。我们将用  $7.3 \text{ kcal/mol}$  这一数值。在典型的细胞环境下，这些水解作用的实际的  $\Delta G$  约为  $-12 \text{ kcal/mol}$ 。



ATP, AMP和ADP是可以相互转变的。腺苷酸激酶（亦称肌激酶）催化下列反应：



ATP的一个酐键水解时所释放的自由能可用于推动一种需要输入自由能的反应，比如肌肉收缩。而ATP则由ADP和 $P_i$ 形成，这是在化能营养生物中燃料分子被氧化时或在光能营养生物中光被捕获时发生的。这个ATP-ADP循环是生物体系中能量交换的基本方式。

有些生物合成反应是由类似于ATP的核苷酸所推动的。诸如鸟苷三磷酸（GTP），尿苷三磷酸（UTP）和胞苷三磷酸（CTP）。这些核苷酸的二磷酸形式分别以GDP, UDP和CDP表示。有些酶催化末端磷酸基从一个核苷酸转移到另一个核苷酸，如下列反应：

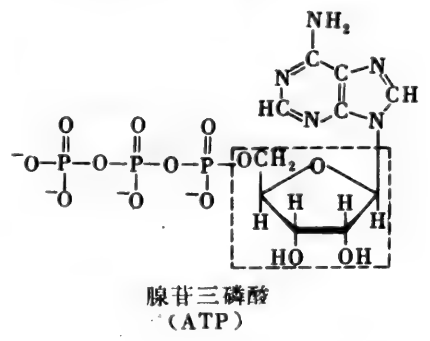
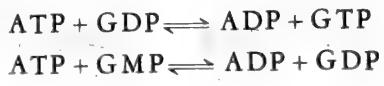


图11-2 腺苷三磷酸，由一个腺嘌呤、一个核糖和一个三磷酸单位组成。

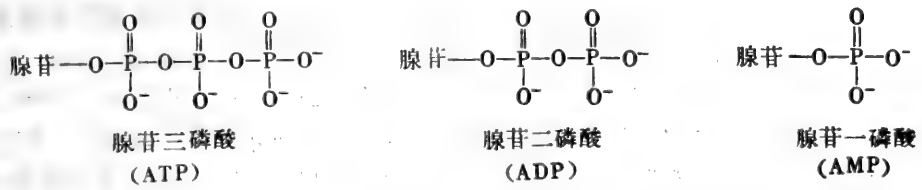


图11-3 ATP, ADP和AMP的结构。（腺苷是由腺嘌呤和与其相连的核糖组成的。）

### ATP不断形成又不断消耗

ATP在生物体系中的作用是自由能的主要的直接供体而不是自由能的贮藏形式。在典型细胞中，ATP分子在它形成之后一分钟内就消耗掉了。ATP的转换率非常高。例如，一个静卧的人24小时内消耗约40公斤ATP。在激烈活动时，ATP的利用速率可高达每分钟0.5公斤。运动、主动转运、信号放大和生物合成等只有当ATP不断地由ADP再生时才能发生（图11 4）。光能营养生物捕获光中的自由能以形成ATP，而化能营养生物则靠燃料分子的氧化以形成ATP。

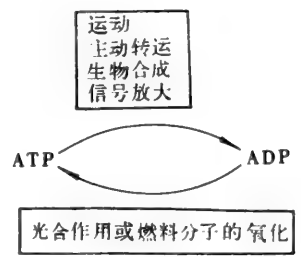
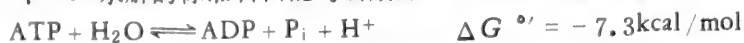


图11-4 ATP-ADP循环是生物体系中能量交换的基本方式。

## ATP具有较高的基团转移潜势的结构基础

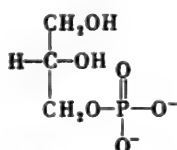
让我们比较一下ATP水解的标准自由能与磷酸酯，如甘油 3 磷酸水解的标准自由能：



甘油 3 磷酸水解的  $\Delta G^{\circ'}$  的数量要比ATP水解的小得多。这意味着与甘油 3 磷酸相比,ATP 具有较强的趋势将其末端磷酰基转移给水。

换言之,ATP具有较高的磷酸基团转移的潜势。

ATP具有较高的磷酸基团转移潜势的结构基础是什么呢?要回答这个问题,必须先研究



甘油-3-磷酸

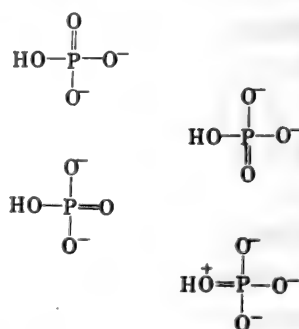


图11-5 正磷酸根的主要共振形式。

ATP及其水解产物ADP和 $\text{P}_i$ 的结构,因为 $\Delta G^{\circ'}$ 决定于产物和反应物间自由能之差。已证明在这方面有两个重要的因素:静电斥力和共振稳定化作用。在pH 7下,ATP的三磷酸部分带有约四个负电荷。由于这些负电荷彼此靠近,所以互相排斥得很厉害。当ATP被水解时,这些带负电荷的基团之间的静电排斥就减小了。另一个使ATP具有高的基团转移潜势的因素

是ADP和 $\text{P}_i$ 比ATP具有较大的共振稳定化作用。例如,正磷酸根有许多能量近似的共振形式(图11-5)。与此相反,ATP的末端部分,以每一个磷酸根计算,重要的共振形式就较少。图11-6中所列的形式就不大可能存在,因为两个磷原子竞相争夺氧的电子对。其次,与带正电荷的磷原子相邻的氧原子上有一正电荷,这在静电力方面是不利的。

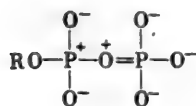


图11-6 ATP末端部分的不大可能的共振形式。

在生物体系中还有各种其它的化合物也有很高的转移磷酸基的潜势。事实上,其中有一些,如磷酸烯醇式丙酮酸、乙酰基磷

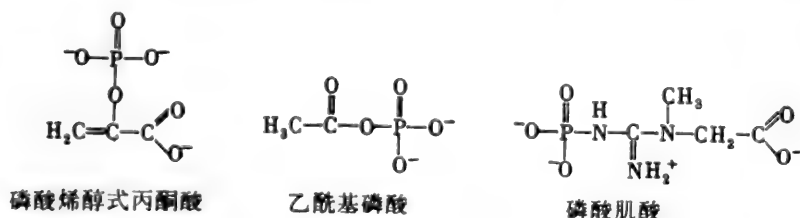


图11-7 具有比ATP更高的磷酸基转移潜势的化合物。

酸、磷酸肌酸等（图11 7),具有比ATP还高的基团转移潜势。这意味着磷酸烯醇式丙酮酸能将其磷酸基转移给ADP而形成ATP。实际上，这就是糖的降解过程中产生ATP的一种方式。

表 11-2 某些磷酸化合物水解的自由能

化 合 物	$\Delta G'$ (kcal/mol)
磷酸烯醇式丙酮酸	-14.8
氨甲酰磷酸	-12.3
乙酰基磷酸	-10.3
磷酸肌酸	-10.3
焦磷酸	-8.0
ATP (产生ADP)	-7.3
葡萄糖1 磷酸	-5.0
葡萄糖6 磷酸	-3.3
甘油3 磷酸	-2.2

注意：在表内所列化合物中，磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸基转移潜势最高。

有意义的是ATP的基团转移潜势居于生物学上重要的磷酸化分子(表11 2)的潜势之间。这种居间的位置使得ATP能够有效地起着磷酸基载体的作用。

ATP通常称为高能磷酸化合物，其磷酸酐键则称为高能键。必须注意这些键本身毫无特殊之处。只有在这一意义上它们是高能键，即它们水解时释放很多自由能，其理由已如上述。李普曼给予具有高的磷酸基转移潜势的化合物的术语“高能键”和它的符号~P是生动、简明和有用的表达方式。事实上，李普曼的工作引起了人们对于生物能学的兴趣。

ATP的水解使偶联反应的平衡偏移10<sup>8</sup>倍

考虑一个不输入自由能在热力学上就不利的化学反应有助于了解ATP在能量偶联上的作用。假定A转变为B的标准自由能变化为+ 4 kcal/mol。



根据方程式13（181页），这一反应在25℃下的平衡常数K'eq为：

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K'_{eq} = 10^{-\Delta G' / 1.36} = 1.15 \times 10^{-3}$$

因此，当B与A的摩尔比等于或大于1.15 × 10<sup>-3</sup>时，A不能自发地转变成B。但当[B]/[A]之比大于1.15 × 10<sup>-3</sup>而反应又与ATP的水解相偶联时，A就能够转变为B。新的总反应是：



其标准自由能变化- 3.3kcal/mol是A转变成B的ΔG°' (+ 4 kcal/mol)与ATP水解的ΔG°' (- 7.3kcal/mol)之和。这一偶联反应的平衡常数为：

$$K'_{eq} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} \cdot \frac{[\text{ADP}]_{eq}[\text{P}_i]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}} = 10^{3.3/1.36} = 2.67 \times 10^2$$

平衡时，[B]与[A]之比为：

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K'_{eq} \frac{[\text{ATP}]_{eq}}{[\text{ADP}]_{eq}[\text{P}_i]_{eq}}$$

细胞中产生ATP的系统将[ATP]/[ADP][Pi]之比维持在高水平上，典型的是500上下。就这一比值而论，

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = 2.67 \times 10^2 \times 500 = 1.34 \times 10^5$$

这意味着在[B]/[A]的比值达到1.34 × 10<sup>5</sup>这一数值为止，ATP的水解能够使A转变为B。

这一平衡的比值与  $1.15 \times 10^{-3}$  有显著不同,  $1.15 \times 10^{-3}$  是不包括ATP水解的反应  $A \rightleftharpoons B$  的平衡比值。换言之, 与ATP水解的偶联使得B与A的平衡比增大了约  $10^8$  倍

我们在这里理解到作为能量偶联剂的ATP的作用在热力学上的实质 细胞利用光或可被氧化的底物作为自由能的来源从而维持ATP的高水平 于是一个ATP分子的水解就会使一个偶联反应的产物与反应物的平衡比发生很大的改变, 增为大约  $10^8$  倍 更普遍地说,  $n$  个ATP分子的水解会使一偶联反应 (或反应序列) 的平衡比增为  $10^{8n}$  倍。例如, 在一偶联反应中三个ATP分子的水解会使平衡比增为  $10^{24}$  倍。因此, 只要使一个热力学上不利的反应序列与足够数目的ATP分子的水解相偶联, 就可使之变为热力学上有利的反应。还应着重指出, 上述偶联方程中的A和B具有非常普遍的意义。例如, A和B可能代表一种蛋白质的不同构象, 如肌肉收缩中的那样。另一方面, A和B也可能是一个细胞内外一种离子或分子的浓度, 如在养分的主动转运时那样。还有, A和B可能表示不同的化学物质, 例如由简单的前体变为复杂分子的生物合成中那样。以后的各章将讨论生物过程中许多重要的能量偶联机理。

### NADH和FADH<sub>2</sub>是燃料分子氧化

#### 作用中主要的电子载体

化能营养生物从例如葡萄糖和脂肪酸这些燃料分子的氧化取得自由能。在需氧生物中, 最终的电子受体是O<sub>2</sub>。不过, 电子并非直接从燃料分子或其降解产物传递给O<sub>2</sub>, 而是这些底物把电子传递给特殊的载体, 或是吡啶核苷酸, 或是黄素。这些载体的还原型再通过一个电子传递链把它们的高电势电子传递给O<sub>2</sub>, 这种链位于线粒体的内膜中。由于这种电子流动, 由ADP和P<sub>i</sub>形成ATP。这一过程称为氧化磷酸化 (第14章), 它是需氧生物中ATP的主要来源。另外, 由燃料分子的氧化所产生的高电势电子也能用于生物合成, 即那些除ATP外还需要还原能力的生物合成。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)是燃料分子氧化作用中主要的电子受体(图11-8)。NAD<sup>+</sup>起反应的部分是它的烟酰胺环。在底物的氧化作用中, NAD<sup>+</sup>的烟酰胺环接受一个氢离子和两个电子, 这等于一个氢负离子。这一载体的还原型称为NADH。

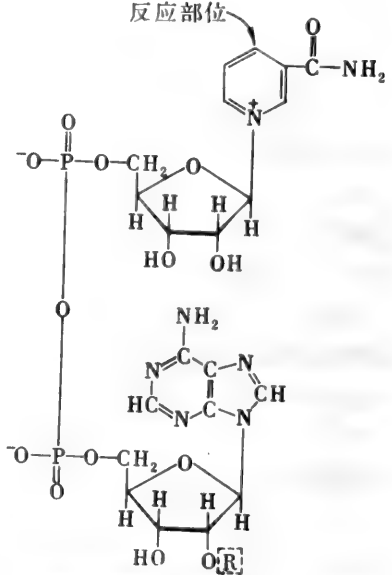
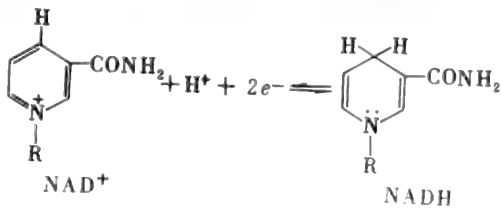


图11-8 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>)的氧化型的结构 在NAD<sup>+</sup>中, R = H; 在NADP<sup>+</sup>中, R = PO<sub>3</sub><sup>-</sup>。



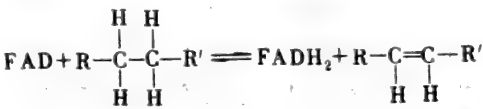


NAD<sup>+</sup>为下列类型的许多反应中的电子受体:



在这一脱氢反应中，底物的一个氢原子直接传递给NAD<sup>+</sup>，而另一个氢原子则出现在溶剂中。底物所丢失的两个电子都传递给烟酰胺环。

在燃料分子的氧化中另一种主要的电子载体是黄素腺嘌呤二核苷酸（见图11-9）。这种载体的氧化型和还原型的缩写分别为FAD和FADH<sub>2</sub>。FAD是下列类型反应的电子受体:



FAD起反应的部分为其异咯嗪环（图11 10）。FAD和NAD<sup>+</sup>一样，也是两个电子的受体。然而与NAD<sup>+</sup>不同的是,FAD接受底物所丢失的是两个氢原子。NADH和 FADH<sub>2</sub>的电子传递电势和氧化还原反应的热力学将在第14章中讨论。

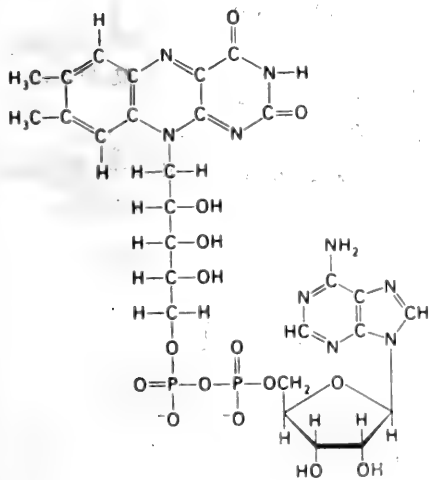


图11-9 黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）的氧化型的结构。

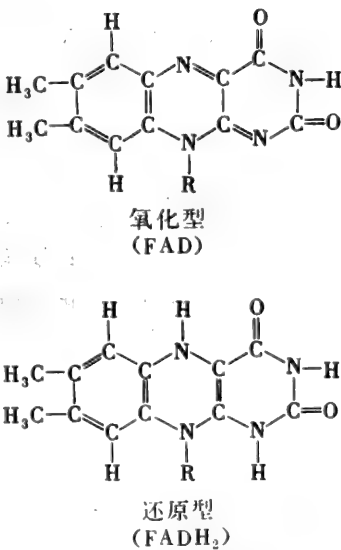


图11 10 FAD和FADH<sub>2</sub>起反应部分的结构。

NADPH是还原性生物合成中主要的电子供体

在大多数生物合成中，前体是比产物更为氧化的。因此，除ATP外,还需要还原能力。

例如，在脂肪酸的生物合成中，加上去的 C<sub>2</sub> 单位的酮基就通过几个步骤还原为次甲基。这一反应系列需要输入四个电子。



大多数还原性生物合成中的电子供体是还原型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) (图11-8)。NADPH与NADH的区别在于前者的腺苷部分的2' 羟基为磷酸所酯化。NADPH的氧化型以NADP<sup>+</sup>表示。NADPH以和NADH一样的方式携带电子。不过，**NADPH几乎仅用于还原性生物合成，而NADH则主要用于产生ATP。**NADPH上额外的磷酸基是一个靶子，它是为这一分子辨认酶的目的而设的。NADPH与NADH之间的区别在生物学上的意义将在以后讨论 (253页)。

在没有催化剂的情况下NADH、NADPH和FADH<sub>2</sub>与O<sub>2</sub>反应极慢，注意到这一点很重要。同样，在没有催化剂的情况下ATP的水解也很慢。这些分子在动力学上是十分稳定的，尽管从热力学上来讲，有着很大的推动力使这些电子载体与O<sub>2</sub>发生反应和使ATP与水发生反应。这些分子在没有专一催化剂时的稳定性对于它们的生物学功能是很必要的，因为这使得酶能够控制自由能和还原能力的流动。

### 辅酶A是酰基的普遍的载体

辅酶A是代谢中的另一种核心分子。1945年李普曼发现许多酶所催化的乙酰化反应都需要一种耐热的辅助因子。这种辅助因子称为**辅酶A (CoA)**，A代表**乙酰化作用**。几年以后将其分离出来并确定了结构 (图11-11)。CoA中末端的硫氢基是它的活性部位。酰基通过硫酯键与CoA相连。所形成的衍生物称为**酰基 CoA**。常与酰基相连的酰基是乙酰基，这一衍生物称为**乙酰 CoA**。乙酰CoA水解的ΔG<sup>o'</sup>是一个很大的负值：

乙酰 CoA + H<sub>2</sub>O ⇌ 乙酸 + CoA + H<sup>+</sup>      ΔG<sup>o'</sup> = -7.5 kcal/mol  
换言之，乙酰 CoA转移乙酰基的潜势很大。CoA是活化的乙酰基或其它酰基的载体，就像ATP是活化的磷酸基的载体一样。

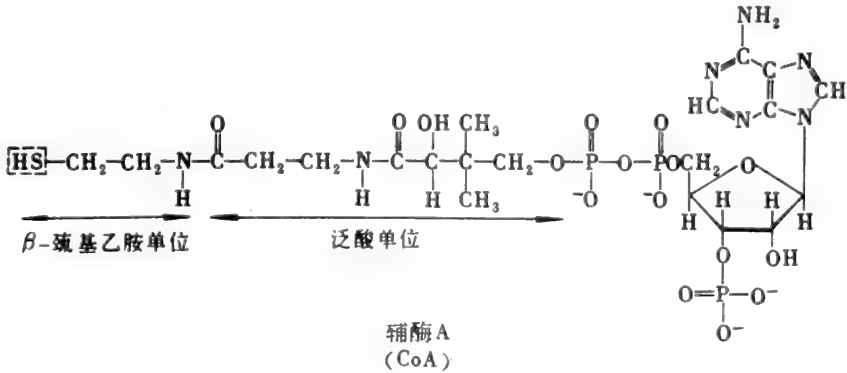
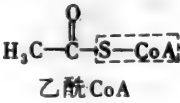
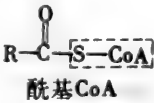


图11 11 辅酶A (CoA) 的结构。

在研究代谢的过程中，我们还会遇到其它活化基团的载体，其中一部分列于表11-3中。这些载体引起各种各样生化反应中活化基团的相互交换。它们确实在所有的生命形式中具有非常类似的作用。它们的普遍存在是生物化学中统一性的特征之一。

表11-3 代谢中的一些活化的载体

载体分子	活化形式的携带基团	载体分子	活化形式的携带基团
ATP	磷酸基	生物素	CO <sub>2</sub>
NADH和NADPH	电子	四氢叶酸	一碳单位
FADH <sub>2</sub>	电子	S-腺苷甲硫氨酸	甲基
辅酶A	酰基	腺苷二磷酸葡萄糖	葡萄糖
硫辛酰胺	酰基	胞苷二磷酸二酰基甘油	磷脂酸
焦磷酸硫胺素	醛		

### 大多数水溶性维生素是辅酶的组分

李普曼曾说过：“医生喜欢在处方中用维生素而千百万人也服用维生素，但要了解为什么生物需要维生素以及如何利用它们却需要大量精巧的生物化学研究工作。”维生素类是有机

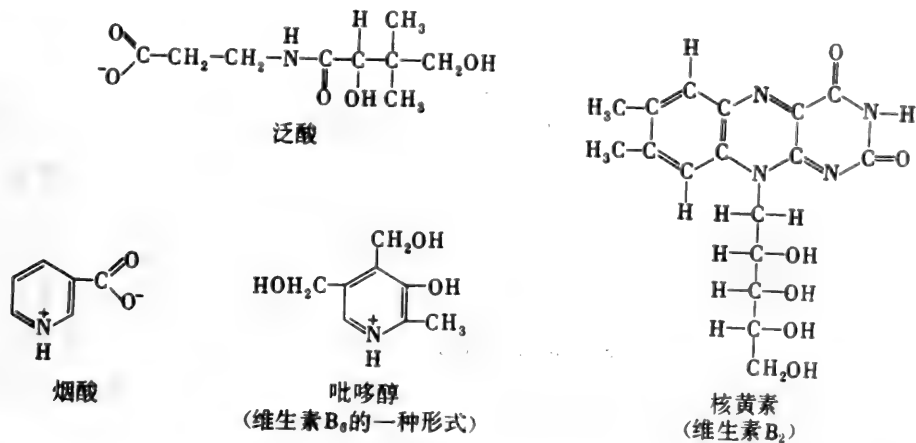


图11-12 某些水溶性维生素的结构。

分子，高等动物食物中需要少量的这些分子。在所有的生命形态中，这些分子起着几乎相同的作用，但高等动物却丧失了合成它们的能力。有两类维生素：脂溶性的，以A、D、E、K等字母代表；水溶性的，统称为维生素B复体。水溶性维生素的大多数，其生物化学作用是已知的。事实上，它们大多是辅酶的组分（表11-4）。例如，核黄素（维生素B<sub>2</sub>）是FAD的前体，而泛酸则是辅酶A的组分。

关于脂溶性维生素（图11-13）作用的分子基础所知较少。正常的血凝作用所需要的维生素K参与谷氨酸残基羧化为γ-羧基谷氨酸的羧化作用（134页）。维生素A（视黄醇）是视黄醛的前体，视黄醛则是视觉色素（701页）中吸收光的基团。缺乏这种维生素会造成夜盲症。此外，幼龄动物的生长也需要维生素A。钙和磷的代谢是由一种激素所调节的，这种激素则

是由维生素D衍生而来的（367页）维生素D的缺乏使生长中的动物的骨骼形成受到损害。大鼠的不孕是缺乏维生素E的结果。这种维生素保护不饱和的膜脂类使免受氧化。

表 11-4 某些水溶性维生素的辅酶衍生物

维 生 素	辅 酶 衍 生 物
硫胺素（维生素B <sub>1</sub> ）	焦磷酸硫胺素
核黄素（维生素B <sub>2</sub> ）	黄素腺嘌呤二核苷酸和黄素单核苷酸
烟酸（尼克酸）	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺 （维生素B <sub>6</sub> ）	磷酸吡哆醛
泛酸	辅酶A
生物素	与羧化酶以共价键结合
叶酸	四氢叶酸
钴胺素（维生素B <sub>12</sub> ）	钴胺酰胺辅酶

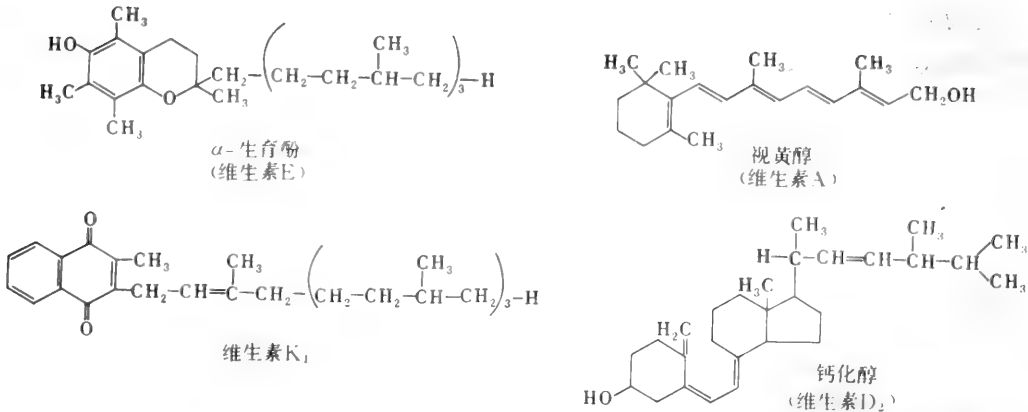


图11-13 某些脂溶性维生素的结构。

### 从食物中汲取能量的各个阶段

让我们先大致了解高等生物体内产生能量的过程,在随后的几章中将仔细研究这些反应。克雷布斯（Hans Krebs）把从食物氧化产生能量的过程描写为三个阶段。在第一阶段中，食物的大分子分解为小的单位。蛋白质被水解为组成它的二十种氨基酸，多糖被水解为单糖如葡萄糖，脂肪被水解为甘油和脂肪酸（图11 14）。这一阶段不产生有用的能量。在第二阶段中，这些为数众多的小分子降解为少数几种简单的单位，而这些单位在代谢中起着关键的作用。事实上，其中的大多数——糖、脂肪酸、甘油和几种氨基酸——都被转化为乙酰CoA中的乙酰基。在这一阶段中也产生一些ATP，但是与乙酰CoA中的乙酰基完全氧化所产生的ATP量相比,是很少的。第三阶段由柠檬酸循环和氧化磷酸化组成，这是燃料分子氧化作用的最后的共同途径。乙酰CoA将乙酰基带入这个循环中，乙酰基则在此循环中完全氧化为CO<sub>2</sub>。每有一个乙酰基被氧化，就有四对电子被转移到NAD<sup>+</sup>和FAD上。然后，当电子从这些

载体的还原型流向 $O_2$ 时,就有ATP产生,这一过程称为氧化磷酸化。由食物的降解所产生的ATP,大多是在第三阶段形成的。

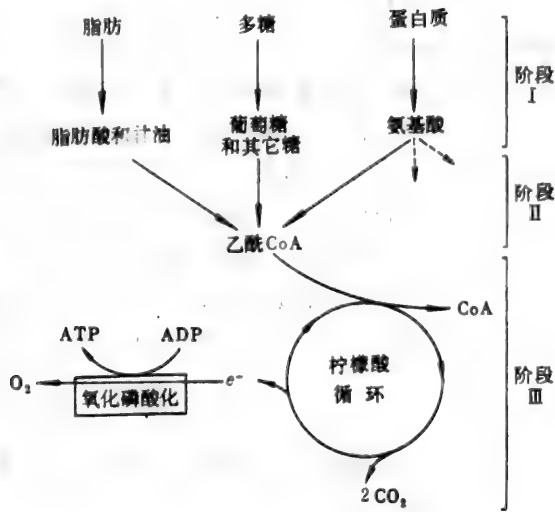


图11-14 从食物中汲取能量的几个阶段。

### 代谢过程是由各种机理所调节的

甚至最简单的细菌细胞也能具有千种以上相互独立的反应。显然,这些交织在一起的整套反应必须受到严格的调节。其次,代谢的调节又必须是灵活的,因为细胞的外界环境并不是固定不变的。研究多种多样的生物后,人们已证明有着许多种调节代谢的机理。必须着重指出,最重要的代谢途径已差不多完全被阐明,但关于其调节的知识仍处在襁褓之中。今天在生物化学中,有争论的问题大多是既费脑筋又很重要。

代谢调节中的重要机理是某些酶的数量控制。这一调节方式在细菌方面研究得较为详尽。关于利用乳糖所需要的半乳糖苷酶和其它蛋白质的合成速率的控制是一个经典的例子,在第28章中将详细讨论。近年的研究表明,某些酶的降解速率也同样受到控制。某些酶的催化活性的控制也可以起到调节代谢的作用。一种普遍而又重要的机理就是可逆的变构控制。例如,许多生物合成途径中的第一个反应被这一途径的最终产物通过变构作用所抑制,这种相互作用称为反馈抑制。某些酶的活性也被共价的修饰所调节,比如特定的丝氨酸残基的磷酸化所调节。

代谢的一个重要的一般原理是生物合成途径和降解途径几乎总是截然不同的。由于能量的原因,这种区分是必要的,在以后几章中就会明白。它也有利于代谢的控制。在真核生物中,代谢的调节和灵活性也因区域化 (compartmentation) 而受到促进。例如,脂肪酸的氧化在线粒体中发生,而脂肪酸的合成则在细胞溶质 (细胞质的可溶部分) 中发生。区域化作用把这些对立的反应分隔开了。

代谢中的许多反应,有一部分是由细胞的能量状态所控制的。能量状态的一个指标就是

能荷，它与ATP的摩尔分数加上ADP的摩尔分数之半成比例，因为ATP含有两个酸酐键，而ADP只有一个。因此，能荷的定义是：

$$\text{能荷} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

能荷之值在 0（全是AMP）到 1（全是ATP）之间。阿特金森，D. (Daniel Atkinson) 曾证明，高能荷抑制产生ATP的途径，而促进利用ATP的途径。将这种途径的反应速率对能荷作图，则曲线在靠近能荷为0.9处最陡，通常它们在此处相交（图11-15）。显然，控制这些途径的设计正好将能荷保持在相当狭小的范围之内。换言之，细胞的能荷也像pH一样，受到缓冲作用的保护。大多数细胞的能荷在0.80至0.95的范围之内。能量状态的另一种指标是磷酸化潜势，其定义为：

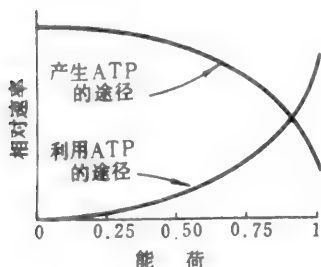


图11-15 能荷对典型的产生ATP的途径（分解代谢）和典型的利用ATP的途径（合成代谢）的影响。

$$\text{磷酸化潜势} = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]}$$

与能荷相反，磷酸化潜势依赖于 $\text{P}_i$ 的浓度并与来自ATP的可利用的自由能成正比。

## 概要

通过称为代谢作用的一整套高度整合的、相互交织的化学反应，细胞从其外界环境中汲取能量并将食物转变为其组分。对于了解代谢作用的力能学来说，最有价值的热力学概念就是自由能。自由能是在恒温恒压下一个体系作有用功的能力的度量。只有当自由能的变化（ $\Delta G$ ）为负值时，反应才能自发进行。反应的 $\Delta G$ 与反应途径无关，它仅决定于反应物的性质及其活度（有时浓度即近似于活度）。当反应物和产物的活度均为一个单位时所发生的反应的自由能变化称为标准自由能变化（ $\Delta G^\circ$ ）。生物化学家常用 $\Delta G'^\circ$ ，即在pH 7下的标准自由能变化。ATP是生物体系中的能量货币，它是一个高能分子，因为它含有两个酸酐键。当ATP水解时，这两个带负电荷的基团间的静电斥力就减小了。还有，因为共振，ADP和 $\text{P}_i$ 也比ATP稳定。ATP的水解能将一偶联反应的平衡移动到 $10^8$ 倍。

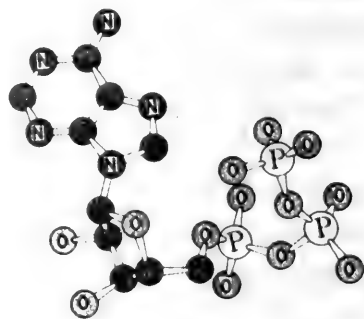


图11-16 腺苷三磷酸（ATP）的模型。

代谢作用的基本目的是形成ATP、NADPH和大分子的前体。ATP用于肌肉收缩和细胞的其它运动、主动转运和生物合成。NADPH带有两个高电势的电子，它提供还原能力，使较为氧化的前体合成为细胞的组分。ATP和NADPH不断产生又不断被消耗掉。在需氧生物体内，由食物汲取能量的过程有三个阶段。第一阶段中，大分子分解为小分子，如氨基酸、糖和脂肪酸。第二阶段中，这些小分子降解为少数简单的单位，这些单位在代谢中起着重要的作用。其中的一种就是乙酰CoA中的乙酰基，CoA是活化的酰基的载体。代谢的第三阶段

是柠檬酸循环和氧化磷酸化, 此时燃料完全氧化为 $\text{CO}_2$ , 而当电子流向最终的受体 $\text{O}_2$ 时则产生ATP。

代谢通过各种方式受到调节。由于蛋白质合成和降解速率的调节, 某些重要的酶的数量受到控制。此外, 某些酶的催化活性还受到变构的相互作用(如反馈抑制)和共价的修饰而得到调节。区域化作用和生物合成与降解途径的区分也对代谢调节有贡献。能荷决定于ATP、ADP和AMP的相对量, 它也在代谢调节中起作用。高的能荷抑制产生ATP的(分解代谢的)途径而促进利用ATP的(合成代谢的)途径。

## 习 题

- 当反应物起始时为等摩尔浓度时, 下列各反应的方向是什么? 利用表11-2中的数据。
  - $\text{ATP} + \text{肌酸} \rightleftharpoons \text{磷酸肌酸} + \text{ADP}$
  - $\text{ATP} + \text{甘油} \rightleftharpoons \text{甘油3-磷酸} + \text{ADP}$
  - $\text{ATP} + \text{丙酮酸} \rightleftharpoons \text{磷酸烯醇式丙酮酸} + \text{ADP}$
  - $\text{ATP} + \text{葡萄糖} \rightleftharpoons \text{葡萄糖6-磷酸} + \text{ADP}$
- 对于焦磷酸和乙酰基磷酸的水解, 表11-2中 $\Delta G^{\circ'}$ 的数据告诉你什么?
- 就下列反应
$$\text{ATP} + \text{丙酮酸} \rightleftharpoons \text{磷酸烯醇式丙酮酸} + \text{ADP}$$
  - 利用表11-2中的数据, 计算此反应在 $25^\circ\text{C}$ 下的 $\Delta G^{\circ'}$ 和 $K'_{eq}$ 。
  - 若ATP与ADP之比为10, 丙酮酸与磷酸烯醇式丙酮酸在平衡时之比是什么?
- 计算葡萄糖6-磷酸异构化为葡萄糖1-磷酸的 $\Delta G^{\circ'}$ 。在 $25^\circ\text{C}$ 下葡萄糖6-磷酸与葡萄糖1-磷酸的平衡比是多少?
- 由乙酸形成乙酰CoA的反应是由ATP推动的:
$$\text{乙酸} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{乙酰CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$
  - 利用本章所给的数据, 计算此反应的 $\Delta G^{\circ'}$ 。
  - 由于普遍存在的无机焦磷酸酯酶的作用, 上述反应中所形成的 $\text{PP}_i$ 在体内会迅速被水解。 $\text{PP}_i$ 水解的 $\Delta G^{\circ'}$ 为 $-8\text{kcal/mol}$ 。计算总反应的 $\Delta G^{\circ'}$ 。 $\text{PP}_i$ 的水解对于乙酰CoA的形成有什么影响?
- 一种酸的 $\text{pK}$ 是它转移质子基团的潜势的度量。
  - 推导出 $\Delta G^{\circ}$ 与 $\text{pK}$ 之间的关系式。
  - 乙酸的 $\text{pK}$ 为4.8, 其电离的 $\Delta G^{\circ}$ 是什么?
- ATP, FAD,  $\text{NAD}^+$ 和CoA在结构上有什么共同特点?
- 血纤维蛋白原含有酪氨酸-O硫酸。提出一种硫酸的活化形式, 此形式能在体内与蛋白质中酪氨酸残基的芳香羟基起反应而形成酪氨酸-O硫酸。  
另外的习题参看W.B.Wood, J.H. Wilson, R.M. Benbow, and L.E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 8; I.M. Klotz, *Energy Changes in Biochemical Reactions* (Academic Press, 1967); and R. Montgomery and C.A. Swenson, *Quantitative Problems in the Biochemical Sciences*, 2nd ed. (Freeman, 1976), ch. 10.

## 第12章 糖 酵 解

我们从糖酵解开始讨论代谢能的产生，糖酵解是生物体系中几乎普遍存在的途径。糖酵解\*是把葡萄糖转变为丙酮酸同时产生ATP的一系列反应。在需氧生物体内，糖酵解是柠檬酸循环和电子传递链的序幕，后者收集葡萄糖中的大部分能量。在有氧条件下，丙酮酸进入线粒体并完全被氧化为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 。如果氧的供应不充分，象在激烈收缩的肌肉中，则丙酮酸转变为乳酸。在某些厌氧生物如酵母中，丙酮酸转变为乙醇。由葡萄糖形成乙醇和乳酸是发酵\*\*作用的例子。

糖酵解的阐明历史久远。生物化学的发展和这一核心途径的阐明实际上是许多人连续工作的结果。1897年，汉斯·巴克纳，H. (Hans Buchner)和巴克纳，E. (Edward Buchner)十分偶然地作出了关键性的发现。他们当时的兴趣是制备酵母的无细胞提取物以便有可能用于治疗疾病。这些提取物的保存必须不加防腐剂，例如不能加酚，于是他们决定试用蔗糖，这是在烹调化学中常用的防腐剂。他们得到了惊人的结果：酵母汁液迅速使蔗糖发酵产生酒精。这一发现意义非常重大。巴克纳兄弟首次证实发酵作用可以在活细胞之外进行。在他们的时代，公认的观点是1860年巴斯德，L. (Louis Pasteur)所断言的，即发酵作用是绝对离不开活细胞的。巴克纳兄弟的偶然发现推翻了这一活力论的教条，打开了现代生物化学的大门。新陈代谢变成了化学。

1905年哈登，A. (Arthur Harden)和杨，W. (William Young)作出了下一个重要的贡献。他们把酵母汁加在葡萄糖溶液中，发现发酵作用几乎是立即就开始了。可是，除非加入无机磷酸盐，否则发酵的速率不久就会显著减慢。其次，他们还发现在发酵过程中，所加入的无机磷酸盐消失了，因此他们推断，无机磷酸盐掺入到糖磷酸酯中去了。哈登和杨分离出了一种六碳糖二磷酸酯，后来证明它就是果糖1,6-二磷酸。他们也发现酵母汁中含有两类发酵所必须的物质：“酒化酶”(zymase)和“辅酒化酶”(cozymase)。他们发现如果将酵母汁透析或热至 $50^\circ\text{C}$ ，其活性就丧失了。然而，经过透析已失活的酵母汁再与加过热而失活的酵母汁混合在一起后，又变得有活性了。因此，活性依赖于两类物质的存在：一类是不耐热的、不能被透析的组分（称为酒化酶），另一类是耐热的、可被透析的部分（称为辅酒化酶）。我们现在知道“酒化酶”包括许多酶\*\*\*，而“辅酒化酶”则包括金属离子、腺苷三磷酸(ATP)、腺苷二磷酸(ADP)和辅酶类，如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NAD}^+$ )。

几年以后用肌肉的提取物所进行的研究证明乳酸发酵的许多反应和酒精发酵的相同。这是一项激动人心的发现，因为它揭示了生物化学中作为基础的统一性。全部糖酵解途径是在1940年以前阐明的，主要是由于下面一些人的贡献：恩伯顿，G. (Gustav Embden)、迈耶

\* 糖酵解 (glycolysis) ——是由希腊文glycos(糖甜)和lysis(分解)派生而来的。

\*\* 发 酵——是一种产生ATP的过程，此过程中有机物既是电子供体又是受体。发酵可在无氧条件下发生，是巴斯德发现的。巴斯德称发酵是“不要空气的生命”。

\*\*\* 酶 (enzyme) ——1878年库恩，F. W. (Friedrich Wilhelm Kühne)所创造的名词，指催化活性很强的物质，以前称为酵素 (ferment)。这个字是由希腊文en(在内)和zyme(曲)派生而来的。



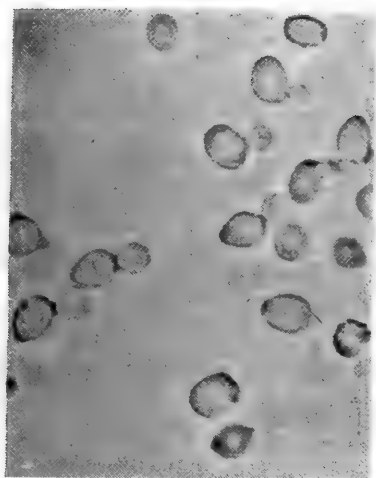


图12-1 光学显微镜下的酵母细胞。[蒙Dr. Randy Schekman 特许。]

霍夫, O. (Otto Meyerhof)、纽伯格, C. (Carl Neuberg)、帕纳斯, J. (Jacob Parnas)、瓦勃, O. (Otto Warburg)、科里, G. (Gerty Cori) 和科里, C. (Carl Cori)。糖酵解有时称为恩伯顿-迈耶霍夫 (Embden-Meyerhof) 途径。

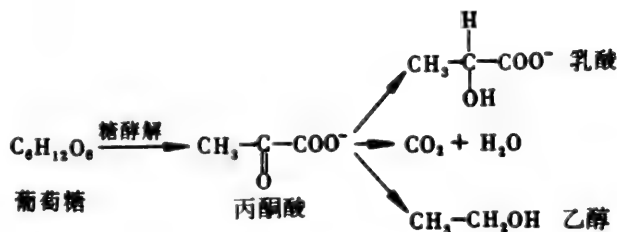


图12-2 葡萄糖的某些变化。

## 单糖的命名和构象

现在我们来研究单糖, 即最简单的碳水化合物的命名法和结构, 而后再研究糖酵解的反应。单糖是具有两个或更多个羟基的醛或酮; 其经验式为  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 。最简单的  $n=3$ , 即甘油醛和二羟丙酮。它们是三碳糖。甘油醛称为醛糖, 因为它含有醛基; 二羟丙酮称为酮糖, 因为它含有酮基。

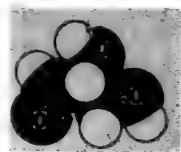
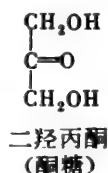
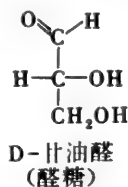
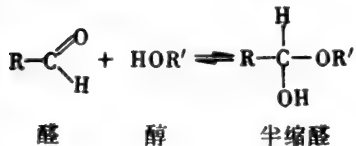
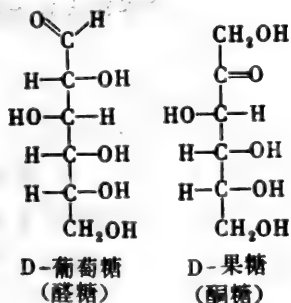


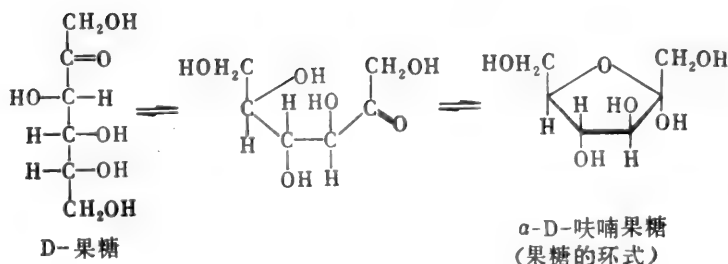
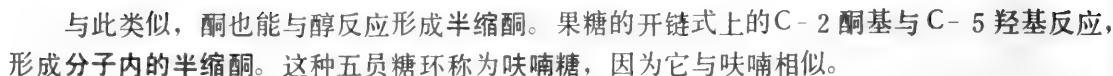
图12-3 D-甘油醛的绝对构型。

甘油醛有一个不对称碳原子。因此这种三碳醛糖有两个立体异构体, 即D-甘油醛和L-甘油醛。前缀D和L表示绝对构型。



含有4、5、6、7个碳原子的糖分别称为四碳糖、五碳糖、六碳糖和七碳糖。它们的式子和立体化学上的相互关系见本章的附录 (215页)。两种常见的六碳糖是D-葡萄糖和D-果糖。前缀符号D表示离醛基或酮基最远的不对称碳, 即C-5的绝对构型和D-甘油醛中的一样。注意葡萄糖是醛糖, 而果糖是酮糖。

葡萄糖和果糖在溶液中的主要形式并不是开链式结构, 而是开链形式的环化, 即形成环。一般来说, 醛会和醇反应形成半缩醛。葡萄糖开链形式中的C-1的醛基与C-5的羟基反应, 形成分子内的半缩醛。所形成的六员糖环称为吡喃糖, 因为它与吡喃相似。



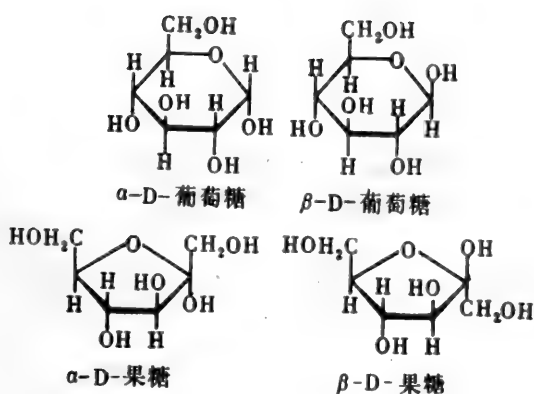
上列吡喃葡萄糖和呋喃果糖的结构式都是哈沃思 (Haworth) 的透视式。这种透视式并不能清楚地表示出环中的碳原子。这个环的平面大致上是与纸平面垂直的, 环上的粗线是离读者最近的。



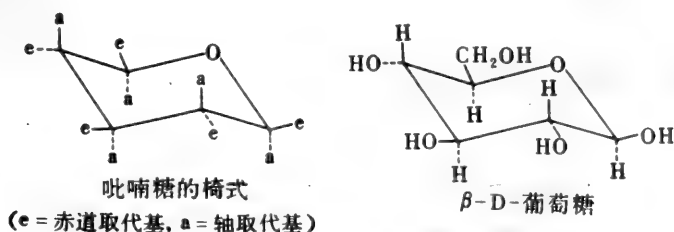
图12-4  $\beta$ -D-葡萄糖的空间填充模型。

葡萄糖环化时创造出了另外一个不对称中心。C-1, 即开链式中的羰基碳原子, 在环式中变成了一个不对称中心。可以形成两个环式结构:  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖和 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖 (图12-4)。 $\alpha$ 这个符号表示连在C-1上的羟基是在环平面下边的;  $\beta$ 表示它是在环平面上边的。C-1碳称为异头的碳原子, 所以 $\alpha$ 型和 $\beta$ 型是异头体。同样的命名法也适用于果糖的环式, 不过 $\alpha$ 和 $\beta$ 指的是连在C-2上的羟基, 即酮糖的异头的碳原子。

α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖和开链式的葡萄糖迅速地互相转变，果糖的呋喃型和开链式也是如此。葡萄糖和果糖这两个词将用来表示这些糖的开链式和环式的平衡混合物。

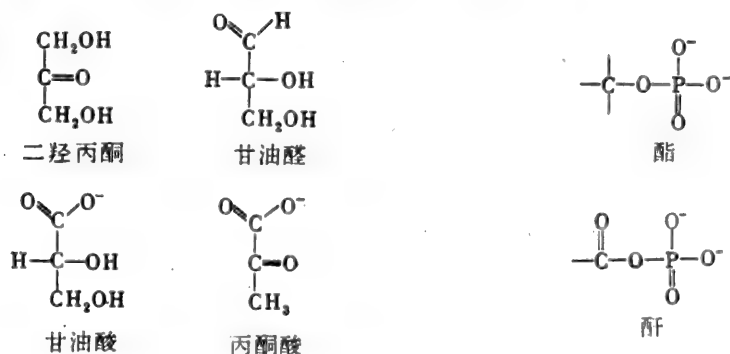


六员的吡喃糖环并不是一个平面，优先存在的构象是椅式。取代基有两种：轴向取代基和赤道取代基。 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖中的所有羟基都是赤道取代基。



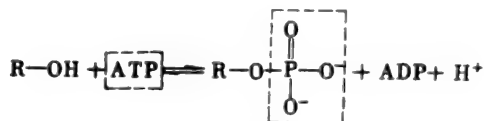
### 关键性的结构和反应一览

牢固地掌握反应物的结构并了解所发生反应的类型将有助于学习代谢途径中的一系列变化。糖酵解的中间产物或是有六个碳或是有三个碳。六碳单位是葡萄糖或果糖的衍生物。三碳单位是二羟丙酮、甘油醛或甘油酸和丙酮酸的衍生物。

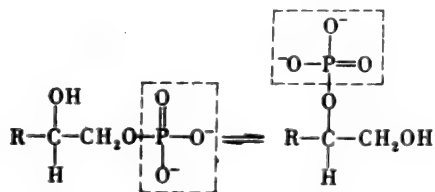


糖酵解中葡萄糖与丙酮酸之间的所有中间产物都是磷酸化的。这些化合物中的磷酸基或是在酯键中或是在酸酐键中。现在让我们看看发生在糖酵解中的几种反应：

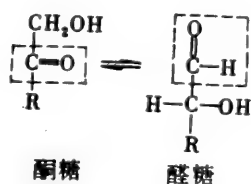
1. 磷酰基的转移 磷酰基从ATP上转移到糖酵解的中间产物上或反之。



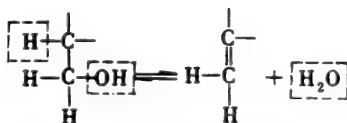
2. 磷酰基的移位 在一个分子内磷酰基从一个氧原子上移到另一个氧原子上。



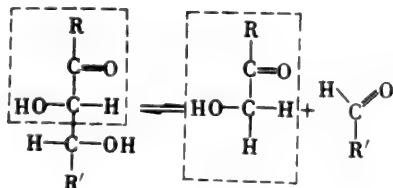
3. 异构化作用 酮糖转变为醛糖或反之。



4. 脱水 减去一分子水。



5. 醛醇裂解 碳-碳键分裂，即醛醇缩合的逆转。



## 由葡萄糖形成果糖1,6-二磷酸

现在我们开始沿着糖酵解途径走下去。这一途径中的反应发生在细胞溶质中。第一阶段，

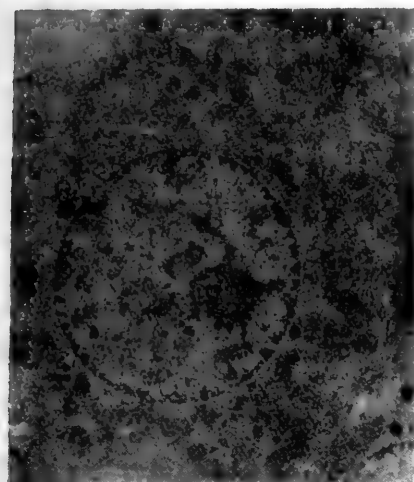
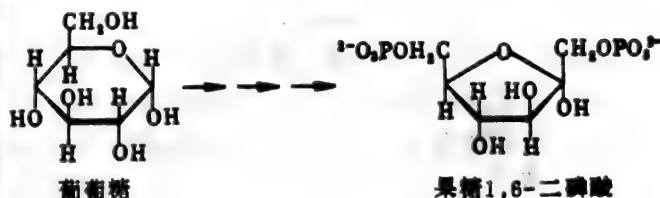


图12-5 肝细胞的电镜照片。糖酵解发生在细胞溶质中。[蒙Dr. Anne Hubbard 特许。]



即葡萄糖转变为果糖1,6-二磷酸，包括三个步骤：一个磷酸化反应，一个同分异构化反应，再有第二个磷酸化反应。糖酵解中这些起始步骤的作用是形成一种能够迅速裂解为磷酸化的三碳糖单位的化合物。下一步就是从三碳单位中汲取能量。

葡萄糖通过特殊的载体或主动转运系统（678页）进入大多数细胞。在细胞里面的葡萄糖只有一种去向：被ATP磷酸化形成葡萄糖6-磷酸。磷酸基从ATP上转移到葡萄糖的C-6的羟基上是由己糖激酶所催化的。

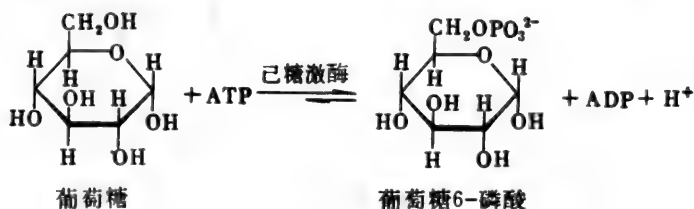


图12-6 酵母己糖激酶中 $\alpha$ -碳的主链示意图。这个二聚体的酶的两个相同的亚基以不对称的方式彼此相互作用。葡萄糖（方框1）和ATP（方框2）结合在每一个二聚体的催化部位上。另有一个ATP分子（方框3）结合在亚基的界面上。[蒙Dr. Thomas Steitz 特许。]

磷酸基的转移是生物化学中的基本反应。将磷酸基从ATP上转移至受体上的酶称为激酶。因此，己糖激酶就是把ATP上的磷酸基转移到各种六碳糖（己糖）上的酶。己糖激酶也像所有其它激酶一样，其活性需要 $Mg^{2+}$ （或其它二价金属离子如 $Mn^{2+}$ ）。二价金属离子与ATP形成一复合物。图12-7所示为两种可能存在的 $Mg^{2+}$ -ATP复合物的结构。

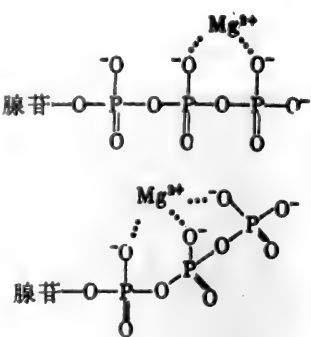
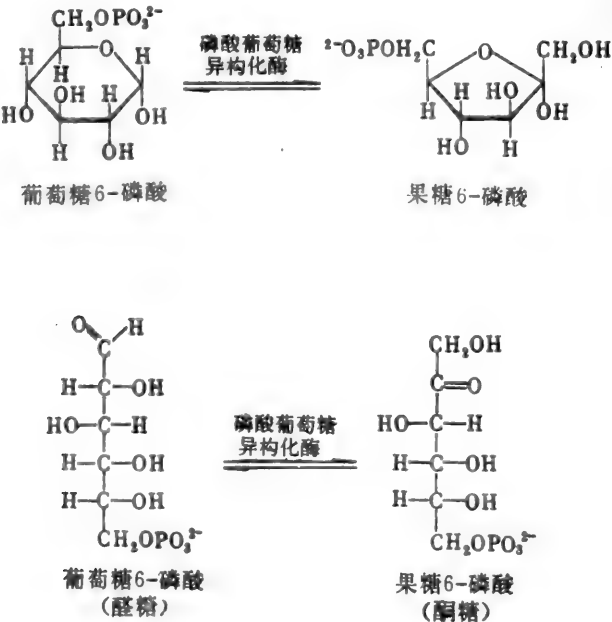
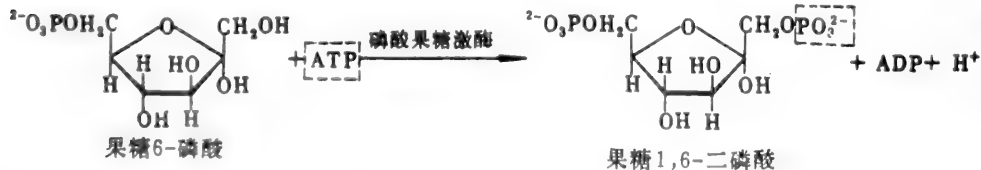


图12-7  $Mg^{2+}$ 与ATP结合的方式。

糖酵解中的下一个步骤是葡萄糖6-磷酸异构化为果糖6-磷酸。葡萄糖6-磷酸的六员的吡喃糖环转变为果糖6-磷酸的五员的呋喃糖环。回想一下，葡萄糖的开链式中C-1上有一个醛基，而果糖的开链式中C-2上有一个酮基。C-1上的醛基与C-5上的羟基起反应形成吡喃糖环，而C-2上的酮基与C-5上的羟基起反应则形成呋喃糖环。因此，葡萄糖6-磷酸异构化为果糖6-磷酸就是醛糖转变为酮糖。这些糖的开链式可表示这一反应的实质。



异构化步骤之后是第二个磷酸化反应。果糖6-磷酸被ATP磷酸化为果糖1,6-二磷酸。

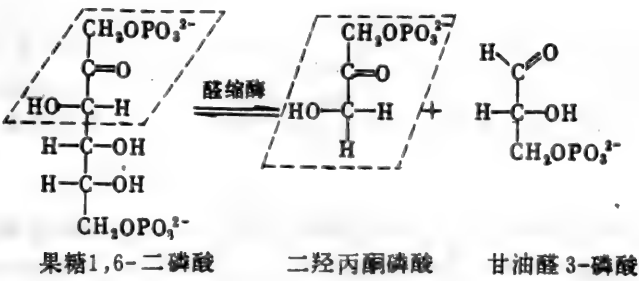


这一反应为磷酸果糖激酶——一种变构酶——所催化。糖酵解的速率严格地依赖于这种酶的

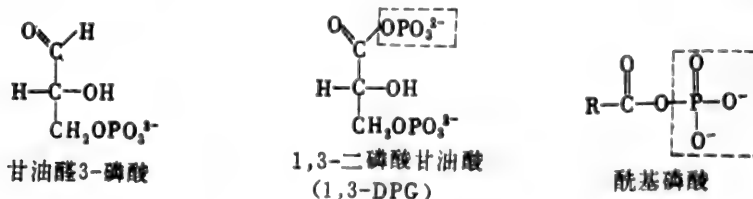
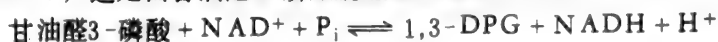
活力水平。磷酸果糖激酶的活力是通过变构作用而受到ATP和其它代谢物所控制的(204页)。

通过裂解和异构化形成甘油醛3-磷酸

糖酵解的第二阶段由四个步骤组成，首先是果糖1,6-二磷酸裂解为甘油醛3-磷酸和二羟丙酮磷酸。糖酵解中的其余步骤则与六碳单位无关而仅包括三碳单位。



反之，到此为止已投入了两分子ATP。现在我们面临着一系列步骤，这些步骤将收集甘油醛3-磷酸中所包含的一部分能量。这一系列反应中的最初步骤是甘油醛3-磷酸转变为1,3-二磷酸甘油酸 (1,3-DPG)，这是由甘油醛3-磷酸脱氢酶所催化的反应。



在这一氧化还原反应中产生了一个高能磷酸化合物。C-1上的醛基转变成成为酰基磷酸，它是磷酸与羧酸的混合酸酐。它具有转移磷酸基的高潜势，形成这种酐所需要的能量来自于醛基的氧化。注意1,3-DPG中的C-1是处于羧酸的氧化水平的。1,3-DPG的形成是底物水平磷酸化的一个例子。这一复杂反应将氧化作用与磷酸化作用偶联起来，其机理将在本章的后面部分讨论 (210页)。

### 由 1,3-DPG 形成 ATP

糖酵解的下一步是1,3-DPG中转移磷酸基的高潜势被用来产生ATP。这实在是糖酵解中第一个产生ATP的步骤。磷酸甘油酸激酶催化磷酸基的转移，从1,3-DPG的酰基磷酸转移到ADP上。产物为ATP和3-磷酸甘油酸。



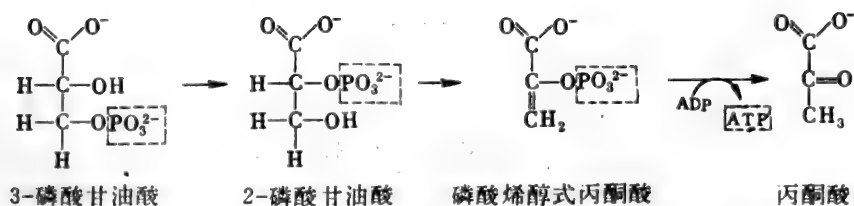
于是，甘油醛3-磷酸脱氢酶和磷酸甘油酸激酶所催化的反应的总结是：

1. 甘油醛3-磷酸被氧化成3-磷酸甘油酸，即醛被氧化成羧酸。
2.  $\text{NAD}^+$ 被还原成 $\text{NADH}$ 。
3. 由 $\text{P}_i$ 和ADP形成了ATP。

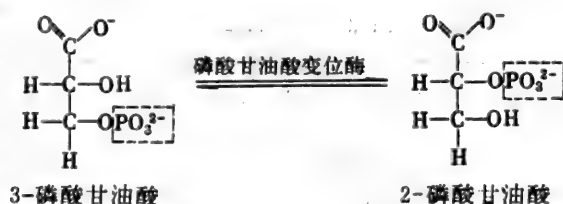
### 丙酮酸的形成和第二个ATP的产生

现在我们面临糖酵解的最后阶段。在这三个步骤中，3-磷酸甘油酸转变为丙酮酸并形成第二个ATP分子。

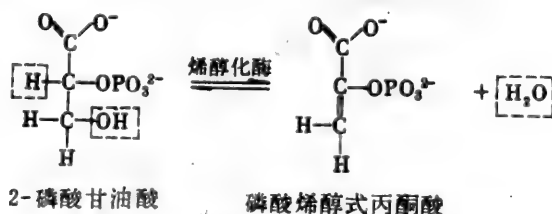




这些反应中的第一个是分子内的重排。磷酸基的位置移动，**3-磷酸甘油酸**转变为**2-磷酸甘油酸**，此反应为磷酸甘油酸变位酶所催化。一般来说，变位酶是一种催化分子内化学基团移位的酶，例如磷酸基的移位。



第二个反应是**2-磷酸甘油酸**脱水形成一个烯醇。烯醇化酶催化**磷酸烯醇式丙酮酸**的形成。这一脱水反应显著地提高了磷酸基的转移势。烯醇式磷酸酯的磷酸基转移势高，而普通的醇的磷酸酯则势低。这种差别的原因将在以后讨论。



最后一个反应是形成**丙酮酸**，同时产生一个**ATP**。磷酸基由**磷酸烯醇式丙酮酸**转移至**ADP**上是由**丙酮酸激酶**所催化的。这一磷酸化作用不是氧化性的，与甘油醛3-磷酸脱氢酶所催化的反应不同。



### 葡萄糖转变为丙酮酸的能量产量

葡萄糖转变为丙酮酸的净反应是：

葡萄糖 + 2 P<sub>i</sub> + 2 ADP + 2 NAD<sup>+</sup> → 2 丙酮酸 + 2 ATP + 2 NADH + 2 H<sup>+</sup> + 2 H<sub>2</sub>O

这样，在葡萄糖转变为丙酮酸时产生了两分子的ATP。表12-1 为消耗或形成ATP的各步骤的概括。记住从果糖1,6-二磷酸形成了两个三碳单位。糖酵解的反应概括如表12-2和图12-8。

表 12-1 糖酵解中ATP的消耗和产生

反 应	每一葡萄糖的ATP 变化
葡萄糖→葡萄糖 6-磷酸	- 1
果糖 6-磷酸→果糖1,6-二磷酸	- 1
2 1,3-二磷酸甘油酸→2 3-磷酸甘油酸	+ 2
2 磷酸烯醇式丙酮酸→2 丙酮酸	+ 2
	净变化 + 2

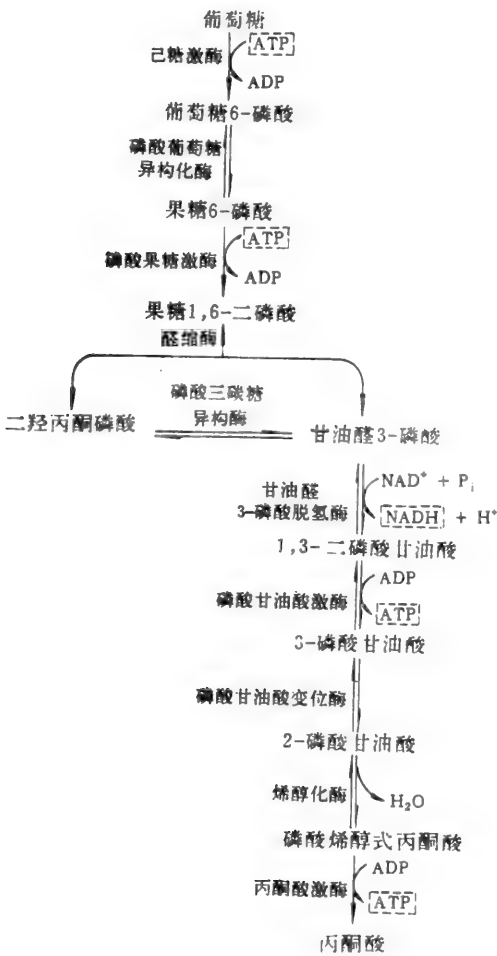


图12-8 糖酵解途径。

表12-2 糖 酵 解 的 反 应

步骤	反 应	酶	类型*	$\Delta G^{\circ'}$	$\Delta G$
1	葡萄糖 + ATP $\longrightarrow$ 葡萄糖6-磷酸 + ADP + H <sup>+</sup>	己糖激酶	a	-4.0	-8.0
2	葡萄糖6-磷酸 $\rightleftharpoons$ 果糖6-磷酸	磷酸葡萄糖异构酶	c	+0.4	-0.6
3	果糖6-磷酸 + ATP $\longrightarrow$ 果糖1,6-二磷酸 + ADP + H <sup>+</sup>	磷酸果糖激酶	a	-3.4	-5.3
4	果糖1,6-二磷酸 $\longrightarrow$ 二羟丙酮磷酸 + 甘油醛3-磷酸	醛缩酶	c	+5.7	-0.3
5	二羟丙酮磷酸 $\rightleftharpoons$ 甘油醛3-磷酸	磷酸三碳糖异构酶	c	+1.8	+0.6
6	甘油醛3-磷酸 + P <sub>i</sub> + NAD <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ 1,3-二磷酸甘油酸 + NADH + H <sup>+</sup>	甘油醛3-磷酸脱氢酶	f	+1.5	-0.4
7	1,3-二磷酸甘油酸 + ADP $\longrightarrow$ 3-磷酸甘油酸 + ATP	磷酸甘油酸激酶	a	-4.5	+0.3
8	3-磷酸甘油酸 $\rightleftharpoons$ 2-磷酸甘油酸	磷酸甘油酸变位酶	b	+1.1	+0.2
9	2-磷酸甘油酸 $\rightleftharpoons$ 磷酸烯醇式丙酮酸 + H <sub>2</sub> O	烯醇化酶	d	+0.4	-0.8
10	磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP + H <sup>+</sup> $\longrightarrow$ 丙酮酸 + ATP	丙酮酸激酶	a	-7.5	-4.0

注意:  $\Delta G^{\circ'}$  和  $\Delta G^{\circ}$  以 kcal/mol 为单位;  $\Delta G$  为实际的自由能变化, 是根据  $\Delta G^{\circ'}$  和典型的生理条件下已知的反应物浓度计算出来的。

- \* 反应类型: (a) 磷酸基转移 (d) 脱水
- (b) 磷酸基移位 (e) 醛醇裂解
- (c) 异构化作用 (f) 与氧化作用偶联的磷酸化作用

### 磷酸果糖激酶是控制糖酵解的关键性酶

糖酵解途径有两重作用: 它使葡萄糖降解产生ATP; 它又给合成反应, 例如长链脂肪酸的形成, 提供原料。细胞调节葡萄糖转变为丙酮酸的速率以满足它的这两项需要。在代谢途径中, 对实质上不可逆的反应发生催化作用的酶是控制作用的潜在部位。在糖酵解中, 由己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶所催化的反应实际上都是不可逆的, 因此可以预料它们既有调节作用, 又有催化作用。事实上, 这三种酶都是调节的部位。

磷酸果糖激酶是糖酵解中最重要的起控制作用的要素。这种四聚体的酶为高水平的ATP所抑制, ATP降低此酶对果糖6-磷酸的亲合力。高浓度的ATP将酶与果糖6-磷酸结合的双曲线形曲线变为S形曲线(图12-9)。变构效应的出现是由于ATP与高度专一的调节部位相结合, 此部位与催化部位截然不同。ATP的抑制作用可被AMP所逆转, 因此当ATP/AMP的比值降低时此酶的活性增高。换言之, 当细胞的能荷低时糖酵解被促进。如前已指出的, 糖酵解也为生物合成提供碳架, 因而可以预料磷酸果糖激酶也会被一种信号所调节, 那就是指示生物合成的构件是富余还是不足的信号。实际上, 磷酸果糖激酶为柠檬酸所抑制, 柠檬酸是柠檬酸循环中早期的中间产物(216页)。

高水平的柠檬酸意味着生物合成的前体有富余, 所以不应有再多的葡萄糖降解以提供这种前体。柠檬酸是通过促进ATP的抑制效应而抑制磷酸果糖激酶的。因此, 当细胞既需要能量又需要合成构件时磷酸果糖激酶活性最高, 这种需要的信号就是ATP/AMP的比值低和柠檬酸的水平低。当需要能量或碳架二者之一时, 此酶的活性中等。当两者都有富余时, 磷酸果糖

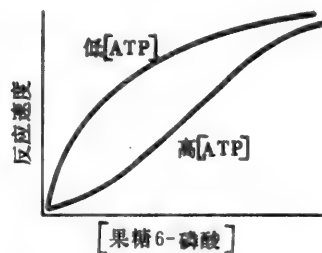


图12-9 磷酸果糖激酶的变构调节。高水平的ATP由于降低此酶对果糖6-磷酸的亲合力而抑制其活性。AMP降低而柠檬酸则加强ATP的抑制效应。

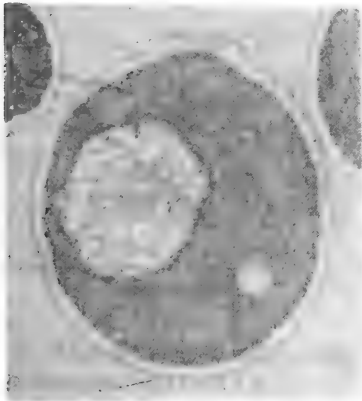
激酶的活性几乎等于零。

己糖激酶和丙酮酸激酶也参与糖酵解速率的调节。从肌肉和肝脏得到的丙酮酸激酶通过变构作用而被ATP抑制，所以当能荷高时磷酸烯醇式丙酮酸转变为丙酮酸被阻断。己糖激酶通过变构作用而被葡萄糖6-磷酸所抑制。当磷酸果糖激酶被阻断时，果糖6-磷酸的水平增高，因而与果糖6-磷酸处于平衡中的葡萄糖6-磷酸的水平也相应地增高。因此，由ATP/AMP比值高或柠檬酸水平高而引起的磷酸果糖激酶的抑制作用也会使己糖激酶受到抑制。在肝脏中即使葡萄糖6-磷酸水平高，葡萄糖也会被磷酸化为葡萄糖6-磷酸，这是因为葡萄糖激酶的存在，它与己糖激酶不同。葡萄糖激酶对葡萄糖的 $K_M$ 很高，所以只有当葡萄糖很多时它才有效。葡萄糖激酶的作用是为糖原的合成提供葡萄糖6-磷酸，糖原是葡萄糖的贮藏形式（270页）。在葡萄糖的供应有限时，肝脏中葡萄糖激酶的高 $K_M$ 就给大脑和肌肉以需要葡萄糖的第一个信号。

为什么磷酸果糖激酶是决定糖酵解速度的而己糖激酶却不是？只要注意到葡萄糖6-磷酸并不仅仅是糖酵解的中间产物，其理由就显而易见了。葡萄糖6-磷酸也能转变为糖原，它也能通过戊糖磷酸途径（253页）被氧化以产生NADPH。糖酵解途径所独有的第一个不可逆的反应，即所谓关键步骤（committed step），就是果糖6-磷酸到果糖1,6-二磷酸的磷酸化反应。因此，磷酸果糖激酶作为糖酵解中的首要控制部位是非常恰当的。一般说来，催化代谢序列中的关键步骤的酶就是该途径中最重要的控制元件。

### 丙酮酸能被转化为乙醇、乳酸和乙酰CoA

从葡萄糖到丙酮酸的反应序列在所有生物中和所有各种细胞内都是非常类似的。反之，丙酮酸产生代谢能的途径却是各式各样的。下面讨论丙酮酸的三个反应：

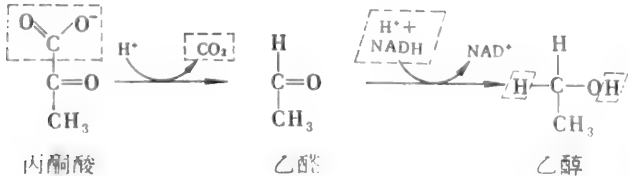


1. 在酵母和几种其它微生物内，由丙酮酸形成乙醇。第一步是丙酮酸的脱羧作用：

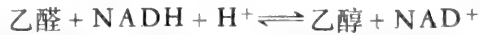


这个反应是由丙酮酸脱羧酶催化的，此酶含有硫胺素焦磷酸作为辅酶。硫胺素焦磷酸是许多种脱羧酶的辅酶（关于其作用机理的讨论见222页）。

图12-10 酵母细胞的电镜照片。[蒙 Lynne Mercer 特许。]



第二步是乙醛被NADH还原为乙醇。在其活性部位上含有锌离子的乙醇脱氢酶催化这一氧化还原反应。



葡萄糖转变为乙醇的过程称为酒精发酵。这一无氧过程的净反应是：

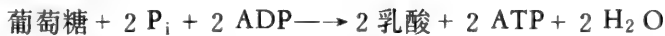


注意NAD<sup>+</sup>和NADH并不出现在这一方程式中，这一点很重要。乙醛被还原为乙醇，因此NAD<sup>+</sup>再生出来，可用于为甘油醛3-磷酸脱氢酶所催化的反应。于是，在葡萄糖转变为乙醇时就没有净氧化还原了。

2. 在许多种微生物内，丙酮酸通常形成乳酸。当氧的量有限时，高等生物的细胞中，例如旺盛活动的肌肉细胞中，也发生这一反应。丙酮酸被NADH还原为乳酸是由乳酸脱氢酶催化的：

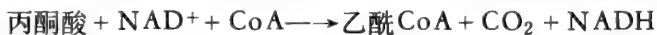


葡萄糖转变为乳酸的总反应是：



也象酒精发酵一样，其中没有净氧化还原。甘油醛3-磷酸氧化时所形成的NADH在丙酮酸的还原反应中消耗掉了。在丙酮酸还原为乳酸或乙醇时NAD<sup>+</sup>的再生维持着糖酵解在无氧条件下继续不断地运转。如果NAD<sup>+</sup>不能再生出来，那么糖酵解到甘油醛3-磷酸就不能再往下进行，就意味着没有ATP的产生。实际上是乳酸的形成赢得了时间，第15章将进行讨论。

3. 当葡萄糖在无氧条件下转变为乳酸（或乙醇）时，只有其中的一小部分能量释放出来了。更多的能量只能在有氧条件下通过柠檬酸循环和电子传递链被汲取出来。这一氧化途径的入口处是乙酰辅酶A（乙酰CoA），它是在线粒体内通过丙酮酸的氧化性脱羧而形成的：



由丙酮酸脱氢酶复合物所催化的这一反应将在下一章中详细讨论。当NADH通过线粒体中的电子传递链把电子最终传递给O<sub>2</sub>时，这一反应和甘油醛3-磷酸的氧化反应所需要的NAD<sup>+</sup>就再生出来了。

许多脱氢酶中NAD<sup>+</sup>的结合部位都是非常相似的

骨骼肌中的乳酸脱氢酶是140kdaI的四聚体，乙醇脱氢酶是84kdaI的二聚体，它们具有十分不同的三维结构。可是，它们结合NAD<sup>+</sup>的部位却是非常相似的（图12-11）。与NAD<sup>+</sup>结合的区域是由四个α螺旋和六条平行的β片组成的。结合在乳酸脱氢酶上的与结合在乙醇脱氢酶上的NAD<sup>+</sup>的构象也几乎是相同的。NAD<sup>+</sup>的腺嘌呤核苷部分结合在一疏水的裂缝中。反之，烟酰胺单位的结合却使得此环的活性一侧在一极性环境中，而另一侧则与酶的疏水残基相接触。结合的NAD<sup>+</sup>具有一种伸长的构象（图12-12），腺嘌呤环与烟酰胺环相距14 Å。

在高分辨率下甘油醛3 磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶（柠檬酸循环中的一种酶，220 页）的三维结构也是已知的。它们的NAD<sup>+</sup>结合部位与乳酸脱氢酶和乙醇脱氢酶中的结合部位极为近似。看来很可能的是，这四种酶所共有的与NAD<sup>+</sup>结合的区域代表了所有与NAD<sup>+</sup>连接的脱氢酶在结构上的基本型式。

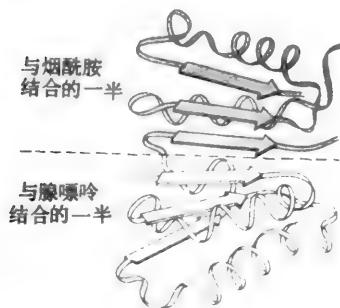


图12-11 脱氢酶中NAD<sup>+</sup>结合部位示意图。与烟酰胺结合的一半和与腺嘌呤结合的另一半在结构上相似。[依据 M. G. Rossmann, A. Liljas, C. -I. Brändén, and L. J. Banaszak. In *The Enzymes*, 3rd ed., vol. 10 (Academic Press, 1975), p. 68. ]

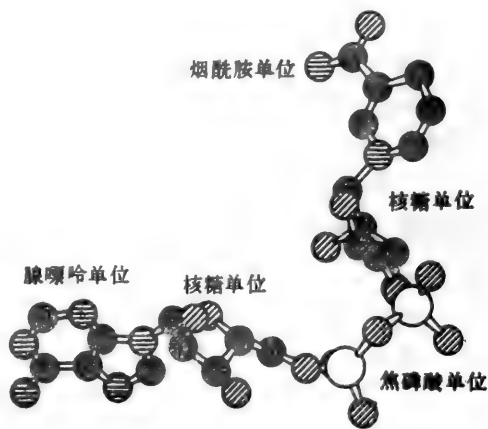


图12-12 NAD<sup>+</sup>的模型。此图所示NAD<sup>+</sup>的构象是在NAD<sup>+</sup>和乳酸脱氢酶的复合物中发现的。

## 葡萄糖引起己糖激酶构象发生很大的变化

酵母己糖激酶的x-射线结晶学研究揭示出，葡萄糖的结合导致此酶构象发生很大变化。己糖激酶是由两个半块组成的，当葡萄糖结合上去时这两个半块就合到一起（图12-13）。葡萄糖使一个半块相对于另一半块旋转12度，其结果是多肽的主链移动多达8 Å。两个半块中的裂缝合上了，结合上去的葡萄糖则为蛋白质所包围，只有6-羟甲基除外。己糖激酶中裂缝的闭合是酶作用中诱导适合（83 页）的突出例子，这种假说是科什兰德(Koshland)首次提出来的。葡萄糖所诱导的结构变化可能有两方面的意义。第一，葡萄糖周围的环境变得极性更小了，这促进磷酸基从ATP上转移过来。第二，己糖激酶包围葡萄糖使得此酶能不以H<sub>2</sub>O当作底物。假设己糖激酶是固定不变的，占据着葡萄糖的—CH<sub>2</sub>OH的结合部位的水分子就会攻击ATP的α-磷酸基。换言之，固定不变的激酶必需既是ATP酶又是激酶。这种不合需要的活性之所以被排除就是因为只有当葡萄糖贴近裂缝时己糖激酶才有酶活性。我们在这里看到了酶的易变性如

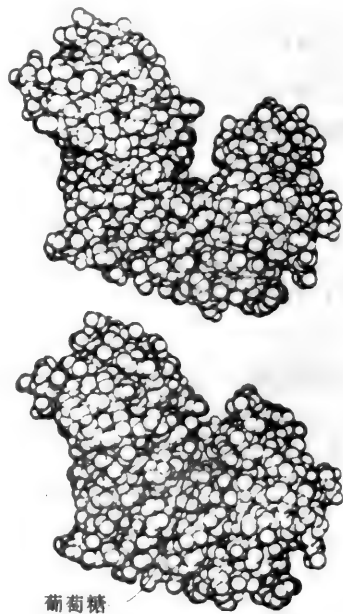


图12-13 结合上葡萄糖后己糖激酶的构象发生显著变化。组成此酶的两个半块合到一起并将底物包围起来。[蒙 Dr. Thomas Steitz 特许。]

何保证了它的专一性。值得注意的是丙酮酸激酶、磷酸甘油酸激酶和磷酸果糖激酶都有两个半块之间的裂缝，当底物结合上去时，这种裂缝就闭合了。己糖激酶中由底物诱导的裂缝闭合代表着一般激酶的重要特性。

### 醛缩酶与二羟丙酮磷酸形成希夫碱

现在我们来讨论醛缩酶，它催化二羟丙酮磷酸和甘油醛3-磷酸的缩合，形成果糖1,6-二磷酸。首先，二羟丙酮磷酸与动物醛缩酶活性部位中的专一的赖氨酸残基形成质子化的希夫碱：

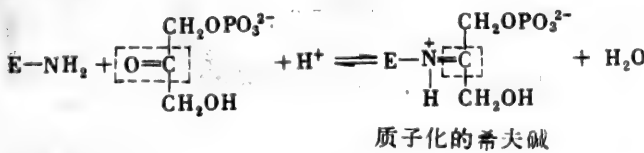
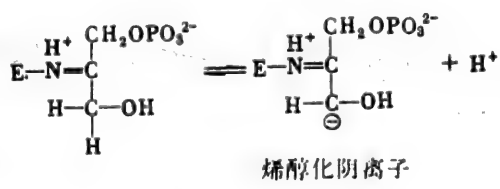
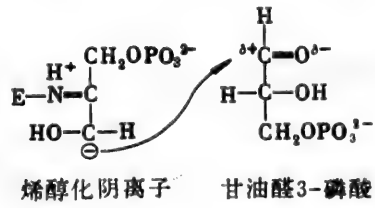


图12-14 醛缩酶晶体的显微照片。  
[蒙Dr. David Eisenberg特许。]

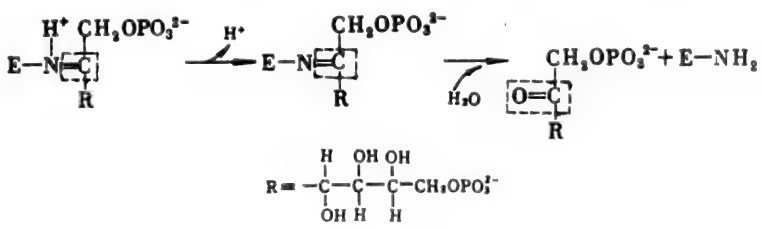
这种质子化的希夫碱在催化作用中起着关键性的作用，因为它促进二羟丙酮磷酸形成烯醇化的阴离子：



然后甘油醛3-磷酸加到这种烯醇化阴离子中间体上去，形成果糖1,6-二磷酸的质子化的希夫碱：



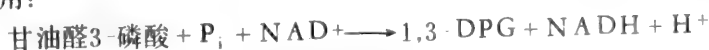
这一希夫碱再脱质子化并水解，产生果糖1,6-二磷酸，酶也再生出来。



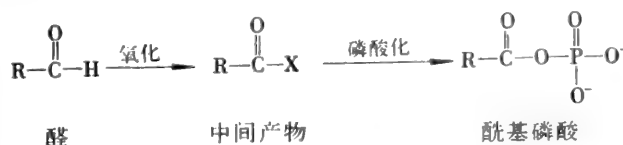
果糖 1,6 二磷酸裂解的途径不过是其形成过程的逆转

### 甘油醛3-磷酸的氧化作用形成硫酯

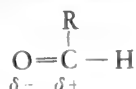
甘油醛3-磷酸脱氢酶形成另一种共价结合的酶-底物中间产物。此酶催化其醛底物的氧化性磷酸化作用：



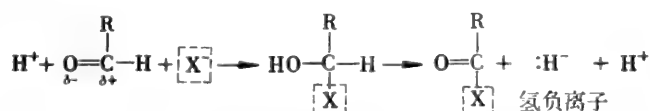
在醛转变为酰基磷酸的过程中，醛首先被氧化：



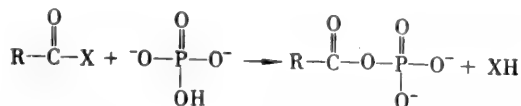
这就需要移去一个氢负离子 ( $:\text{H}^-$ )，它是一个氢原子核和两个电子。从醛上除去氢负离子有很大的障碍，因为羰基有偶极性。羰基中的碳原子已经有部分的正电荷。



使碳原子上的正电荷减少可促成氢负离子的除去。这又由加入一个亲核物质而完成，在下式中以  $\text{X}^-$  代表亲核物质：



氢负离子迅速离开加成化合物，因为此化合物的碳原子上再也没有大的正电荷了。其次，氧化作用中的一部分自由能也保留在酰基中间产物中。正磷酸根加到这一酰基中间产物上就产生一酰基磷酸，它有很大的基团转移潜势。这一反应系列称为底物水平的磷酸化。



现在让我们来看看甘油醛3-磷酸脱氢酶是怎样进行这些步骤的 (图12-15)。亲核物质  $\text{X}^-$  是活性部位中的半胱氨酸残基中的硫氢基。作为底物的醛与这一硫氢基的离子化的形式起反应，形成一半缩硫醛 (hemithioacetal)。下一步是氢负离子的转移。氢负离子的受体是  $\text{NAD}^+$  分子，它牢固地结合在酶上。这一反应的产物是还原型的辅酶  $\text{NADH}$  和硫酯。硫酯是



一种高能的中间产物，相当于上述的酰基中间产物。NADH从酶上解离下来，而NAD<sup>+</sup>又结合到活性部位上去。然后正磷酸根攻击硫酯，形成1,3-DPG，也是一种高能磷酸酯。由3-磷酸甘油醛形成1,3-DPG的关键是一个热力学上不利的反应，即由羧酸形成酰基磷酸的反应；而它是由另一个热力学上有利的反应，即醛的氧化反应所推动的。

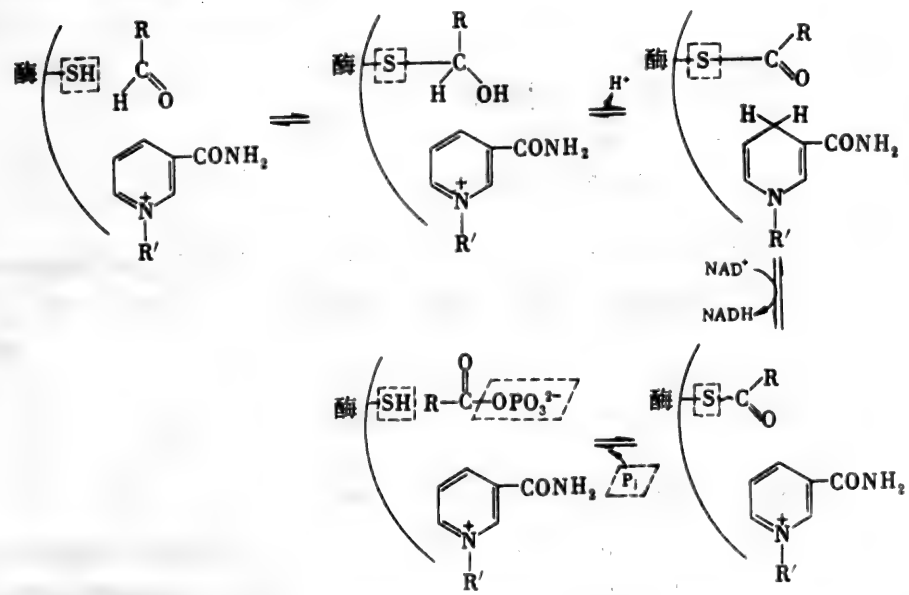
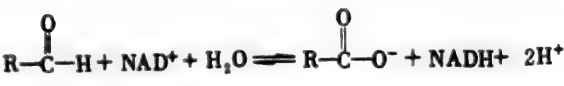
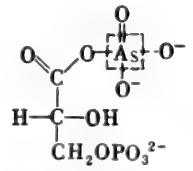
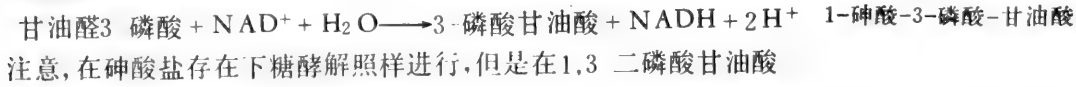


图12-15 甘油醛3-磷酸脱氢酶的催化机理。

这两个反应是由硫酯这一中间产物所偶联的，硫酯保存了氧化反应所释放的大部分自由能。这里我们看到了利用与酶共价结合的中间产物作为能量偶联的机理。

### 砷酸盐（磷酸盐的类似物）起解联剂的作用

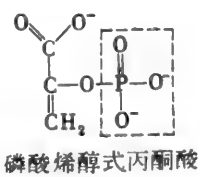
砷酸盐（AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>）在结构和反应性方面都和P<sub>i</sub>极为相似。在甘油醛3-磷酸脱氢酶所催化的反应中，砷酸盐能代替磷酸盐去攻击硫酯中间产物的高能键。这一反应的产物是1-砷酸-3-磷酸甘油酸，但它是不稳定的，与1,3-二磷酸甘油酸不同。1-砷酸-3-磷酸甘油酸和其它酰基砷酸酯都会非常迅速地自发地水解。因此，在砷酸盐存在下的净反应就是：



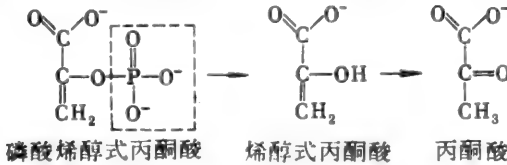
转变为3-磷酸甘油酸时通常所形成的ATP却丢失了。这样，砷酸盐由于形成了非常不稳定的酰基砷酸酯而使氧化作用与磷酸化作用解联了。在生物分子的进化过程中选中了磷而没有选中砷的一个可能的理由就是磷的高能化合物有较大的动力学稳定性。

### 烯醇磷酸酯具有高的基团转移潜势

因为1,3-DPG是一种酰基磷酸酯，它具有高的基团转移潜势。在糖酵解中几个步骤之后又形成另一种高能磷酸化合物。由2-磷酸甘油酸脱水所形成的磷酸烯醇式丙酮酸是一种烯醇磷酸酯。普通醇的磷酸酯水解的 $\Delta G^{\circ'}$ 为 $-3 \text{ kcal/mol}$ ，而磷酸烯醇式丙酮酸的却是 $-14.8$



$\text{kcal/mol}$ 。为什么磷酸烯醇式丙酮酸有如此高的基团转移潜势呢？答案是反应并不停留在转移磷酸基时所形成的烯醇上，而是烯醇进一步转变为酮——即丙酮酸。



烯醇 $\rightarrow$ 酮转变的 $\Delta G^{\circ'}$ 很大，约为 $-10 \text{ kcal/mol}$ 。这比磷酸烯醇式丙酮酸水解为烯醇式丙酮酸的 $\Delta G^{\circ'}$ 大得多，它约为 $-3 \text{ kcal/mol}$ 。因此，磷酸烯醇式丙酮酸的高的磷酸基团转移潜势来自于随后的烯醇 $\rightarrow$ 酮转变的巨大推动力。

表 12-3 红血球中糖酵解中间产物的典型浓度

中 间 产 物	$\mu\text{mol/L}$	中 间 产 物	$\mu\text{mol/L}$
葡萄糖	5000	3-磷酸甘油酸	118
葡萄糖6-磷酸	83	2-磷酸甘油酸	30
果糖6-磷酸	14	磷酸烯醇式丙酮酸	23
果糖1,6-二磷酸	31	丙酮酸	51
二羟丙酮磷酸	138	乳酸	2900
甘油醛3-磷酸	19	ATP	1850
1,3-二磷酸甘油酸	1	ADP	138
2,3-二磷酸甘油酸	4000	$\text{P}_i$	1000

依据 S. Minakami and H. Yoshikawa, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 18 (1965): 345.

### 氧转运的调节剂——2,3-DPG的代谢

回想一下，2,3-二磷酸甘油酸（2,3-DPG）是红血球中氧转运的调节剂。它使脱氧形

式的血红蛋白稳定化从而降低血红蛋白对氧的亲合力（第4章）。红细胞中2,3-DPG的浓度很高，典型的是4 mmol/L。这与大多数其它细胞不同，它们只含有痕量的2,3-DPG。

2,3-DPG的一般作用是在磷酸甘油酸变位酶所催化的3-磷酸甘油酸转变为2-磷酸甘油酸的反应中起辅助因子的作用。

2,3-DPG的合成和降解是糖酵解途径上的支路（图12-16）。二磷酸甘油酸变位酶将1,3-DPG转变为2,3-DPG。

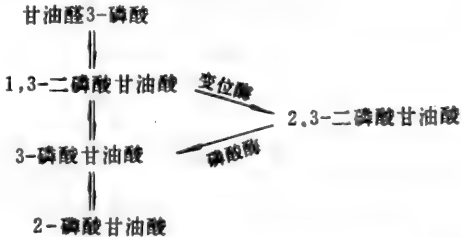
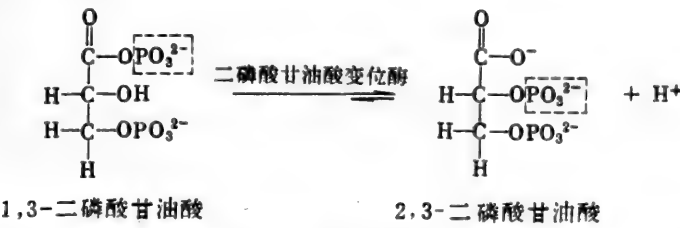
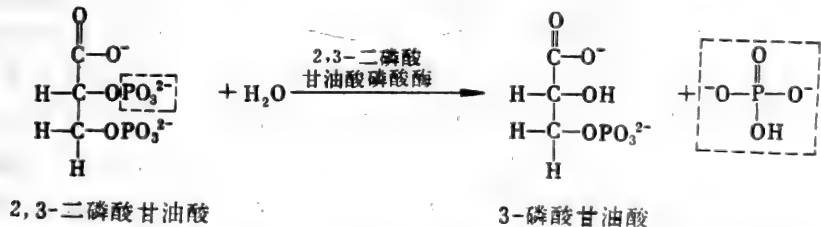


图12-16 2,3-二磷酸甘油酸合成和降解的途径。



2,3-DPG又被2,3-二磷酸甘油酸磷酸酶水解为3-磷酸甘油酸。磷酸酶是催化磷酸酯水解的酶。



这种变位酶作用的机理很有趣。3-磷酸甘油酸是必要的参加者，但在整个化学计算中它并不出现。变位酶同时结合1,3-DPG和3-磷酸甘油酸。在这个三元复合物中，磷酸基从1,3-DPG的1-位上转移到3-磷酸甘油酸的2-位上（图12-17）。

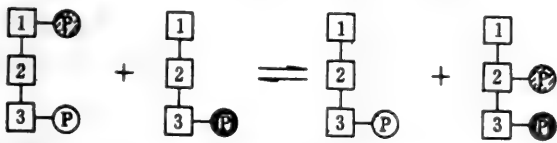


图12-17 3-磷酸甘油酸参与1,3-二磷酸甘油酸到2,3-二磷酸甘油酸的转变示意图。

在这一变位酶的反应中，2,3-DPG是1,3-DPG的强有力的竞争性抑制剂。因此，2,3-DPG合成的速率部分地决定于它本身的浓度。另一个起控制作用的因素是1,3-DPG的浓度，因为此酶并非经常是为1,3-DPG所饱和的。反之，红细胞中3-磷酸甘油酸的浓度却几乎足以使变位酶饱和。因此，2,3-DPG的合成速率是由未结合的1,3-DPG和2,3-DPG的浓度所控制的。

## 红细胞中糖酵解的缺陷会改变氧的转运

红细胞中的糖酵解和氧的转运是由2,3-DPG联系起来的。这意味着糖酵解中的缺陷能够影响氧的转运。事实上,某些具有红细胞中糖酵解遗传缺陷的病人,他们的血液的氧解离曲线是有变化的(图12-18)。

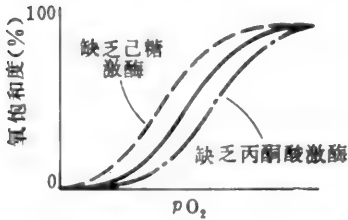


图12-18 正常红细胞(中)、缺乏己糖激酶的病人的红细胞(上)和缺乏丙酮酸激酶的病人的红细胞(下)中氧解离曲线。

在缺乏己糖激酶时,糖酵解中间产物的浓度低,因为葡萄糖的磷酸化,即第一步,削弱了。于是这些红细胞中2,3-DPG的浓度降低了,从而它们的血红蛋白与氧的亲合力高得不正常。缺乏丙酮酸激酶时情况恰好相反。糖酵解中间产物的浓度高得不正常,因为最后一步被阻断了。结果,2,3-DPG的水平大约为正常的两倍,这导致了氧的亲合力低。缺乏己糖激酶和缺乏丙酮酸激酶时氧解离曲线何以不正常一直是一个谜,直到发现2,3-DPG是氧转运的调节剂时问题才解决。

## 概 要

糖酵解是将葡萄糖转变为丙酮酸的一组反应。在需氧生物中,糖酵解是柠檬酸循环和电子传递链的序幕,后二者收集葡萄糖的大部分自由能。糖酵解的十个反应存在于细胞溶质中。在第一阶段中,葡萄糖通过一个磷酸化反应、一个异构化反应和第二个磷酸化反应而转变为果糖1,6-二磷酸。在这些反应中,每一分子葡萄糖消耗两分子ATP,这是为ATP的净合成作准备。在第二阶段中,果糖1,6-二磷酸被醛缩酶裂解为二羟丙酮磷酸和甘油醛3-磷酸,这二者极易互相转化。然后甘油醛3-磷酸被氧化并被磷酸化以形成1,3-DPG,这是一种酰基磷酸酯,具有高的磷酸转移势。当产生一个ATP时,形成了3-磷酸甘油酸。在糖酵解的最后阶段中,通过一个磷酸基移位的反应和一个脱水反应,形成了磷酸烯醇式丙酮酸,这是第二个具有高磷酸转移势的中间产物。当磷酸烯醇式丙酮酸转变为丙酮酸时,产生了第二个ATP。从一分子葡萄糖形成二分子丙酮酸时,净得到二分子ATP。

甘油醛3-磷酸氧化时的电子受体是 $NAD^+$ ,为了糖酵解的继续进行,它必须再生出来。在需氧生物中,糖酵解所形成的NADH通过电子传递链将其电子传递给 $O_2$ ,这当然就再生了 $NAD^+$ 。在无氧条件下, $NAD^+$ 的再生是由于丙酮酸还原为乳酸。在某些微生物中, $NAD^+$ 通常是由于丙酮酸形成了乳酸或乙醇而再生的。这两个过程称为发酵。

糖酵解途径有双重作用:它降解葡萄糖以产生ATP,它也为细胞组分的合成提供建造基石。葡萄糖转变为丙酮酸的速率是受到调节的,以满足细胞的这两大需要。除去由己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶所催化的反应外,在生理条件下糖酵解中的反应都是可逆的。磷酸果糖激酶是糖酵解中最重要的控制部位,它是由高水平的ATP和柠檬酸所抑制而为AMP所活化的。因此,当能量或建造基石的需要增强时它的活性就高。己糖激酶为葡萄糖6-磷酸所抑制,当磷酸果糖激酶钝化时葡萄糖6-磷酸就积累起来。另一控制部位,丙酮酸激酶是由ATP所变构抑制的,因此当细胞的能荷高时,磷酸烯醇式丙酮酸转变为丙酮酸的反应就被阻断。

# 附录：某些糖的立体化学关系

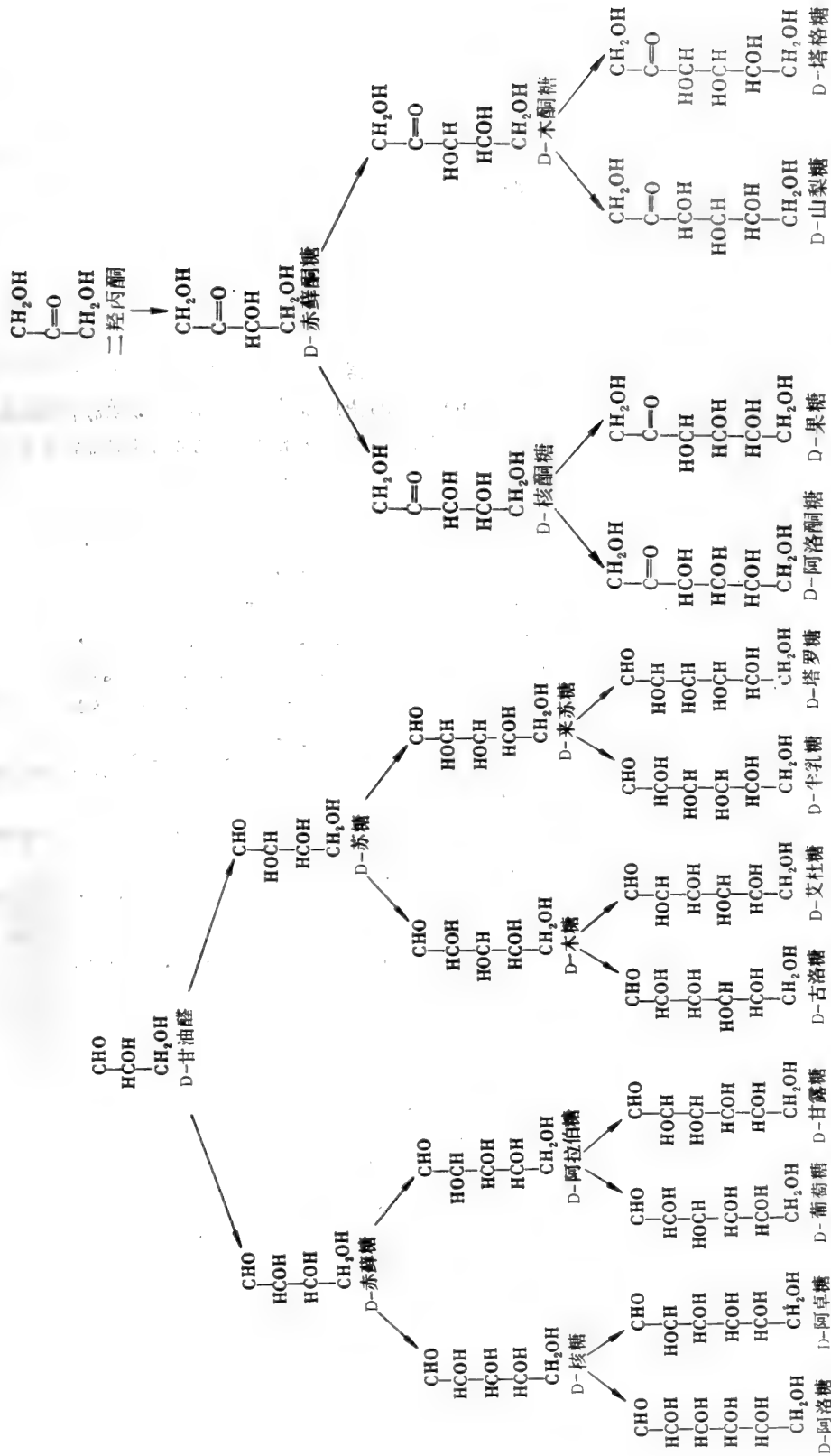


图12 20 含有三、四、五和六个碳原子的D-酮糖的立体化学关系。

图12 19 含有三、四、五和六个碳原子的D-醛糖的立体化学关系。

## 习 题

1. 仅在其碳基碳原子的构型上有差别的糖类称为异头物。差向异构体则在碳基碳原子以外的特殊碳原子的构型上有差别。指出下列各对糖是异头物、差向异构体或是醛糖 酮糖对：
    - (a) D-甘油醛和二羟丙酮
    - (b) D-葡萄糖和D-甘露糖
    - (c) D-葡萄糖和D-果糖
    - (d)  $\alpha$ -D-葡萄糖和 $\beta$ -D-葡萄糖
    - (e) D-核糖和D-核酮糖
    - (f) D-半乳糖和D-葡萄糖
  2. 在C-1上为 $^{14}\text{C}$ 所标记的葡萄糖与糖酵解酶和必要的辅助因子一同保温。所形成的丙酮酸中 $^{14}\text{C}$ 的分布如何？（假定甘油醛3-磷酸与二羟丙酮磷酸的相互转化比起以后的步骤来是非常迅速的。）
  3. 写出葡萄糖转变为乳酸的平衡方程式来。
    - (a) 利用表12-2（205页）的数据并以下列反应
 
$$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{乳酸} + \text{NAD}^+$$
 的 $\Delta G^{\circ'}$ 为 $-6 \text{ kcal}$ 计算葡萄糖转变为乳酸的标准自由能变化。
      - (b) 当各反应物的浓度为：葡萄糖,  $5 \text{ mmol/L}$ ；乳酸,  $0.05 \text{ mmol/L}$ ；ATP,  $2 \text{ mmol/L}$ ；ADP,  $0.2 \text{ mmol/L}$ ； $\text{P}_i$ ,  $1 \text{ mmol/L}$ 时，这一反应的自由能变化（ $\Delta G'$ ，不是 $\Delta G^{\circ'}$ ）是多少？
  4. 当 $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] = 10$ 时，在标准状况下磷酸烯醇式丙酮酸对丙酮酸的平衡比是多少？
  5. 当 $1 \text{ mmol/L}$ 果糖1,6-二磷酸在标准状况下与醛缩酶共同保温时，果糖1,6-二磷酸、二羟丙酮磷酸和甘油醛3-磷酸的平衡浓度各是多少？
  6. 为 $^{14}\text{C}$ 所均匀标记的3-磷酸甘油酸与为 $^{32}\text{P}$ 在C-1上标记的1,3-DPG共同保温，在加入DPG变位酶后所形成的2,3-DPG中放射性同位素的分布如何？
  7. 木糖与葡萄糖结构相同，不过在C-5上有一个氢原子取代了羟甲基。加入木糖就使己糖激酶所引起的ATP水解速率大大提高。为什么？
  8. 磷酸甘油酸变位酶的活性部位有两个组氨酸残基，它们彼此平行，相距约 $4 \text{ \AA}$ 。试提出一可能的催化机理。
- 另外的习题，参看W.B.Wood, J.H.Wilson, R.M.Benbow, and L.E.Hood. *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 9.

## 第13章 柠檬酸循环

前一章讲了糖酵解途径，它使葡萄糖变成丙酮酸。在有氧条件下，由葡萄糖产生能量的下一个步骤是丙酮酸的氧化性脱羧，形成乙酰辅酶A（乙酰CoA，图13-1），然后这种活化的乙酰基通过柠檬酸循环被完全氧化为 $\text{CO}_2$ 。柠檬酸循环是一系列反应，也称为三羧酸循环或克雷布斯（Krebs）循环。柠檬酸循环是燃料分子——氨基酸、脂肪酸和碳水化合物——氧化的最后的共同途径。大多数燃料分子以乙酰-CoA的形式进入这个循环。此循环也为生物合成提供中间产物。柠檬酸循环的反应存在于线粒体内，与糖酵解的反应不同，后者存在于细胞溶质内。

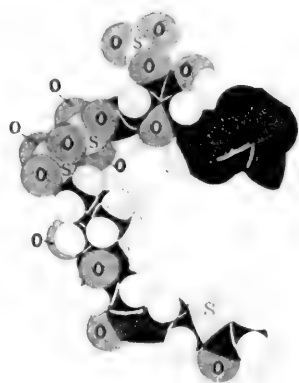


图13-1 乙酰CoA的模型。

### 由丙酮酸形成乙酰辅酶A

存在于线粒体间质（图13-2）中的丙酮酸形成乙酰CoA的氧化性脱羧作用是糖酵解与柠檬酸循环之间的纽带：

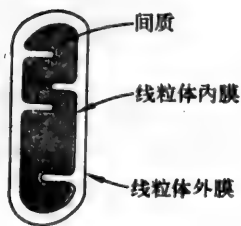


图13-2 线粒体示意图。丙酮酸的氧化性脱羧和柠檬酸循环的一系列反应都在线粒体的间质中进行。

糖酵解产物进入柠檬酸循环的这种不可逆的反应是由丙酮酸脱氢酶复合物催化的。这种非常大的多酶复合物是三种酶的高度整合的集合体，将在本章的后文进行讨论（222—226页）。

### 柠檬酸循环概貌

柠檬酸循环的大致情况如图13-3所示。四碳化合物（草酰乙酸）与二碳的乙酰基单位缩合产生六碳的三羧酸（柠檬酸）。然后柠檬酸的一个异构体发生氧化性脱羧。所形成的五碳化合物（ $\alpha$ -酮戊二酸）再发生氧化性脱羧，产生四碳化合物（琥珀酸）。随后琥珀酸又再生草酰乙酸。两个碳原子以乙酰基单位的形式进入循环，另两个碳原子则以二分子 $\text{CO}_2$ 的形式离开循环。乙酰基的还原程度比 $\text{CO}_2$ 的为低。因此在柠檬酸循环中必定发生了氧化-还原反应。事实上，有四个这样的反应。三个负氢离子（因而也就是六个电子）传递到三个 $\text{NAD}^+$ 分子上，还有一对氢原子（也就是两个电子）传递到黄素-腺嘌呤-二核苷酸（FAD）分子上。当这些电子载体在电子传递链中被 $\text{O}_2$ 氧化时，共产

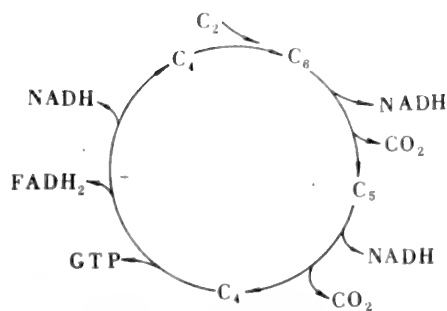
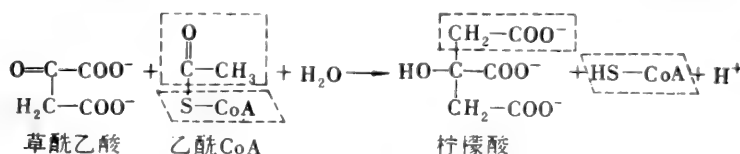


图13-3 柠檬酸循环概貌

生11个分子的腺苷三磷酸 (ATP)。此外，柠檬酸循环每运转一圈，它本身还产生一个高能磷酸键。

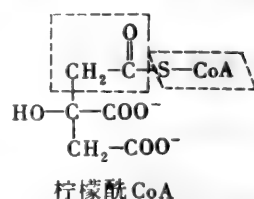
### 草酰乙酸与乙酰辅酶A 缩合形成柠檬酸

这个循环开始于四碳单位草酰乙酸与二碳单位乙酰辅酶A的乙酰基的结合。草酰乙酸与乙酰CoA和H<sub>2</sub>O反应，产生柠檬酸和CoA。

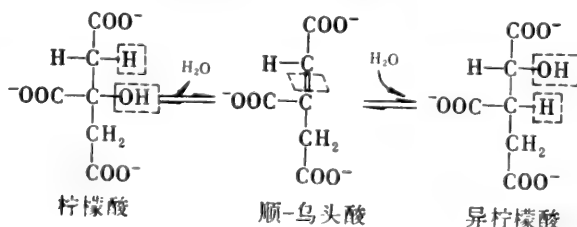


这一反应是醛醇缩合，随后又是水解，它是由柠檬酸合成酶（原来叫作缩合酶）所催化的。草酰乙酸首先与乙酰CoA缩合形成柠檬酰CoA，后者再水解成柠檬酸和CoA。柠檬酰CoA的水解把总反应远远推向柠檬酸合成的方向。

### 柠檬酸异构化为异柠檬酸



柠檬酸必须异构化为异柠檬酸才能使这一六碳单位发生氧化性脱羧作用。柠檬酸的异构化作用是由脱水步骤随后再跟一个水合步骤而完成的。其结果是H和OH的互换。催化这两个步骤的酶称为乌头酸酶，因为假定的中间产物是顺-乌头酸。



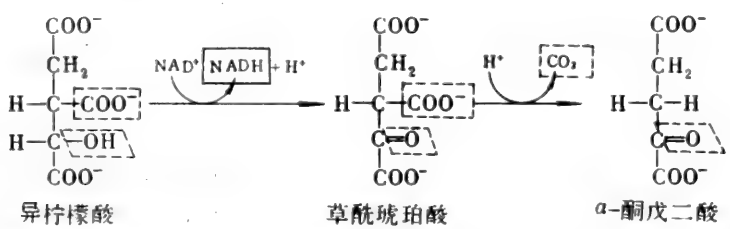
### 异柠檬酸被氧化并脱羧形成α-酮戊二酸

现在我们来到了柠檬酸循环中四个氧化还原反应的第一个。异柠檬酸的氧化性脱羧作用是由异柠檬酸脱氢酶所催化的：





这一反应的中间产物是草酰琥珀酸，当它结合在酶上时迅速丢失CO<sub>2</sub>，产生α-酮戊二酸。



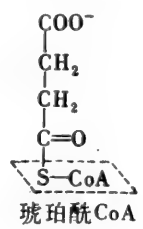
α-酮戊二酸形成的速率在决定整个循环的速率上是重要的，将在后文讨论（231页）。还有一点值得指出的是有两种异柠檬酸脱氢酶。一种对NAD<sup>+</sup>专一，另一种对NADP<sup>+</sup>专一。对NAD<sup>+</sup>专一的酶位于线粒体中，它是柠檬酸循环中重要的酶。对NADP<sup>+</sup>专一的酶，既存在于线粒体中，也存在于细胞质中，它有着不同的代谢功能。

α-酮戊二酸的氧化性脱羧形成琥珀酰辅酶A

异柠檬酸转变为α-酮戊二酸之后便是第二个氧化性脱羧反应，由α-酮戊二酸形成琥珀酰CoA：

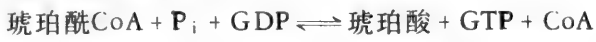
α-酮戊二酸 + NAD<sup>+</sup> + CoA ⇌ 琥珀酰CoA + CO<sub>2</sub> + NADH

这一反应是由α-酮戊二酸脱氢酶复合物所催化的，这是一种有组织的集合体，它包括三种酶。这一反应的机理和丙酮酸转变为乙酰CoA的机理极为相似。所用的辅助因子是一样的：NAD<sup>+</sup>，CoA，硫胺素焦磷酸，硫辛酰胺和FAD。事实上，丙酮酸脱氢酶复合物和α-酮戊二酸脱氢酶复合物有着共同的结构特点(222—226页)。

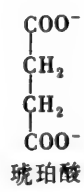


从琥珀酰辅酶A产生一个高能磷酸键

CoA的琥珀酰硫酯是一个高能键。琥珀酰CoA水解的ΔG<sup>o'</sup>约为-8 kcal/mol，可与ATP的(-7.3 kcal/mol)相比。琥珀酰CoA硫酯键的断裂是与鸟苷二磷酸(GDP)的磷酸化相偶联的：



这一极易可逆的反应(ΔG<sup>o'</sup> = -0.8 kcal/mol)是由琥珀酰CoA合成酶所催化的。鸟苷三磷酸(GTP)中的磷酰基又迅即转移给ADP以形成ATP，这一转移反应是由核苷二磷酸激酶催化的。



由琥珀酰CoA产生高能磷酸键是底物水平磷酸化的一个例子。实际上，这是柠檬酸循环中唯一的一个直接产生高能磷酸键的反应。与它相对比的过程是呼吸链的磷酸化(也叫氧化磷酸化)，这是与NADH和FADH<sub>2</sub>被O<sub>2</sub>氧化的反应相偶联的ATP的形成。以前在糖酵解中遇到过两个反应中底物水平的磷酸化：即甘油醛3-磷酸的氧化反应和磷酸烯醇式丙酮酸转变为丙酮酸的反应中的。氧化磷酸化将在下一章中讨论。

## 琥珀酸的氧化再产生草酰乙酸

四碳化合物的反应组成了柠檬酸循环的最后阶段（图13-4）。琥珀酸分三个步骤转变为

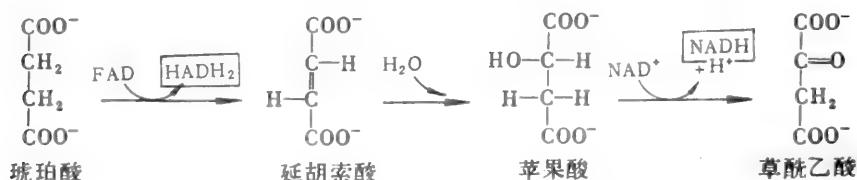


图13-4 柠檬酸循环的最后阶段：从琥珀酸到草酰乙酸。

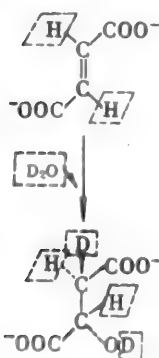
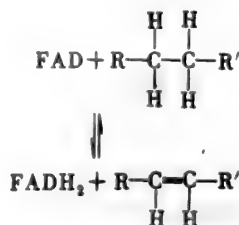
草酰乙酸：一个氧化作用，一个水合作用，第二个氧化作用。于是草酰乙酸又再生出来，为下一轮循环之用，同时能量也以 $\text{FADH}_2$ 和 $\text{NADH}$ 的形式被捕获了。

琥珀酸被琥珀酸脱氢酶氧化为延胡索酸。氢受体是 $\text{FAD}$ 而不是 $\text{NAD}^+$ ，此循环中的其它三个氧化反应都用 $\text{NAD}^+$ 。 $\text{FAD}$ 是这一反应的氢受体，因为自由能的变化不足以还原 $\text{NAD}^+$ 。 $\text{FAD}$ 几乎总是这种类型反应的电子受体。在琥珀酸脱氢酶中， $\text{FAD}$ 的异咯嗪环与酶的组氨酸侧链发生共价结合（以 $\text{E} \cdot \text{FAD}$ 表示）：



琥珀酸脱氢酶中除黄素外还含有四个铁原子和四个无机硫原子。这种酶中没有血红素。铁原子大概是与无机硫化物结合的。

所以，这种类型的蛋白质就称为铁-硫（ $\text{FeS}$ ）蛋白或非血红素铁蛋白。铁硫蛋白在线粒体和叶绿体的电子传递系统中起着重要的作用（238页和335页）。琥珀酸脱氢酶是由两个亚基组成的：一个是70kdal单位，含有 $\text{FAD}$ 和两个铁硫簇；另一个是27kdal单位，含有一个铁硫簇。这种酶与柠檬酸循环中的其它酶不同，它是线粒体内膜的不可分割的一个部分。事实上，琥珀酸脱氢酶是直接连在电子传递链上的。琥珀酸氧化所产生的 $\text{FADH}_2$ 与 $\text{NADH}$ 不同，它并不和酶解离，而是来自 $\text{FADH}_2$ 的两个电子直接传递给酶的 $\text{Fe}^{3+}$ 原子。这些电子的最终受体是分子态氧，下一章将进行讨论。



这个循环的下一步是延胡索酸的水化作用，形成L-苹果酸。延胡索酸酶催化一种立体结构上专一的H和OH的反型加成作用，如氘标记的研究所证明的。OH基只加在延胡索酸双键的一侧；因此只能形成L-苹果酸。

最后，苹果酸氧化形成草酰乙酸。这一反应是由苹果酸脱氢酶催化的， $\text{NAD}^+$ 又是氢受体。



## 柠檬酸循环的化学计算

柠檬酸循环的净反应是：



形成这种化学计算关系的各反应（图13-5和表13-1）概括如下：

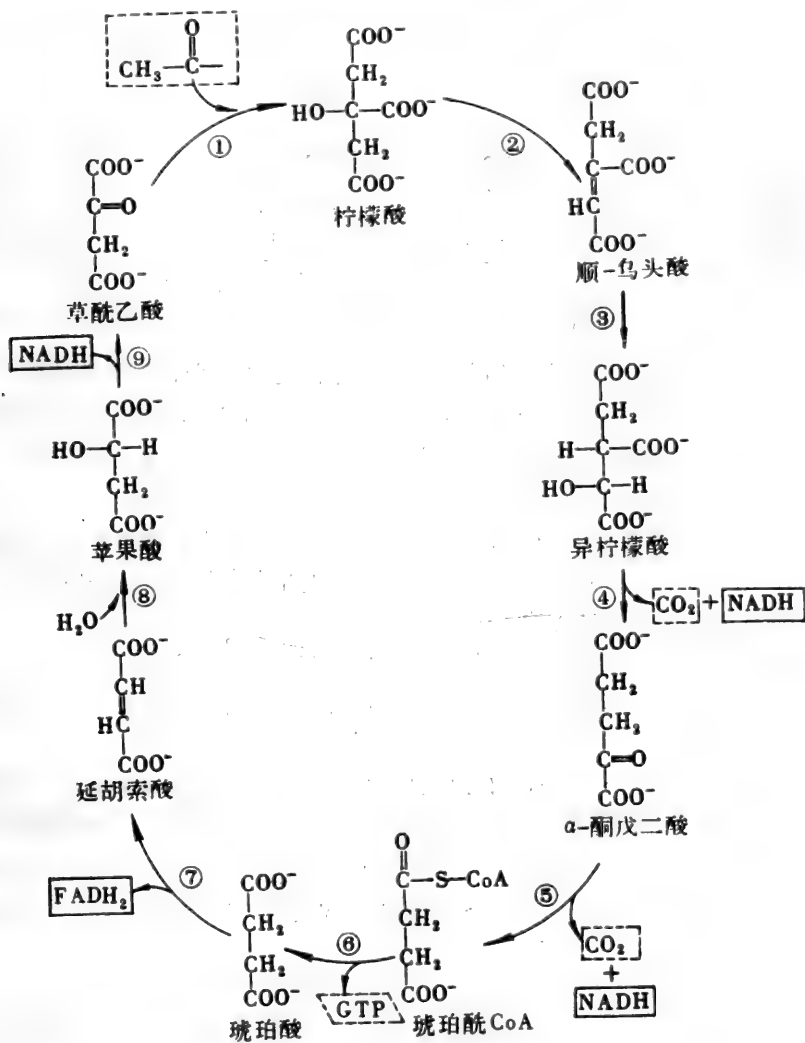


图13-5 柠檬酸循环。

表13-1 柠檬酸循环

步骤	反 应	酶	辅助因子	类型*	ΔG°'
1	乙酰CoA + 草酰乙酸 + H <sub>2</sub> O → 柠檬酸 + CoA + H <sup>+</sup>	柠檬酸合成酶	CoA	a	-7.5
2	柠檬酸 ⇌ 顺-乌头酸 + H <sub>2</sub> O	乌头酸酶	Fe <sup>2+</sup>	b	+2.0
3	顺-乌头酸 + H <sub>2</sub> O ⇌ 异柠檬酸	乌头酸酶	Fe <sup>2+</sup>	c	-0.5
4	异柠檬酸 + NAD <sup>+</sup> ⇌ α-酮戊二酸 + CO <sub>2</sub> + NADH	异柠檬酸脱氢酶	NAD <sup>+</sup>	d + e	-2.0

续

步骤	反 应	酶	辅助因子	类型*	$\Delta G^{\circ'}$
5	$\alpha$ -酮戊二酸 + $\text{NAD}^+$ + $\text{CoA} \rightleftharpoons$ 琥珀酰CoA + $\text{CO}_2$ + $\text{NADH}$	$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物	$\text{NAD}^+$ $\text{CoA}$ $\text{TPP}$ 硫辛酸 $\text{FAD}$ $\text{CoA}$	d + e	-7.2
6	琥珀酰CoA + $\text{P}_i$ - $\text{GDP} \rightleftharpoons$ 琥珀酸 + $\text{GTP}$ + $\text{CoA}$	琥珀酰CoA 合成酶	$\text{FAD}$	f	-0.8
7	琥珀酸 + $\text{FAD}$ (与酶结合的) $\rightleftharpoons$ 延胡索酸 + $\text{FADH}_2$ (与酶结合的)	琥珀酸脱氢酶	$\text{FAD}$	e	~ 0
8	延胡索酸 + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ 苹果酸	延胡索酸酶	无	c	-0.9
9	$\text{L-苹果酸} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons$ 草酰乙酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+$	苹果酸脱氢酶	$\text{NAD}^+$	e	+7.1

\* 反应类型: (a) 缩合 (b) 脱水 (c) 水合 (d) 脱羧 (e) 氧化  
(f) 底物水平磷酸化

1. 在一个乙酰基单位 (来自乙酰CoA) 和草酰乙酸缩合时, 两个碳原子进入循环。在随后的由异柠檬酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶所催化的脱羧反应中, 两个碳原子又以 $\text{CO}_2$ 的形式离开循环。不久就将讨论到, 离开循环的两个碳原子并不是这一轮中进入循环的两个碳原子。

2. 在四个氧化反应中四对氢原子离开循环。两个 $\text{NAD}^+$ 分子在异柠檬酸和 $\alpha$ -酮戊二酸的氧化性脱羧反应中被还原, 一个 $\text{FAD}$ 分子在琥珀酸的氧化反应中被还原, 一个 $\text{NAD}^+$ 分子在苹果酸的氧化反应中被还原。

3. 从琥珀酰CoA的高能硫酯键产生一高能磷酸键 (以 $\text{GTP}$ 的形式)。

4. 消耗了两个分子的水: 一个在柠檬酸的合成中用于柠檬酰CoA的水解, 另一个用于延胡索酸的水合作用。

往下看, 柠檬酸循环中形成的 $\text{NADH}$ 和 $\text{FADH}_2$ 将在电子传递链中被氧化 (第14章)。当电子从这些载体传递到最终的受体 $\text{O}_2$ 时, 有 $\text{ATP}$ 生成。在线粒体中每一 $\text{NADH}$ 产生三个 $\text{ATP}$ , 而每个 $\text{FADH}_2$ 产生两个 $\text{ATP}$ 。注意每一乙酰基单位在柠檬酸循环中只能直接产生一个高能磷酸键。还有11个高能磷酸键是当三个 $\text{NADH}$ 和一个 $\text{FADH}_2$ 被电子传递链氧化时形成的。

分子态氧并不直接参与柠檬酸循环。然而这个循环只有在有氧条件下才运转, 因为线粒体中只有当电子传递到分子态氧时 $\text{NAD}^+$ 和 $\text{FAD}$ 才能再生。糖酵解既有需氧的方式, 也有不需氧的方式, 可是柠檬酸循环却是严格需氧的。回想一下, 糖酵解能够在无氧条件下进行, 因为当丙酮酸转变为乳酸时 $\text{NAD}^+$ 可以再生出来。

### 丙酮酸脱氢酶复合物: 有组织的酶集合体

现在我们来讨论某些反应机理。丙酮酸产生乙酰CoA的氧化性脱羧作用是由丙酮酸脱氢酶复合物催化的, 这是三种酶的有组织的集合体 (表13-2)。这一复合物所催化的总反应是:



这一反应的机理比从它的化学计算式所推测的要复杂得多。除去上述化学计算中的辅助因子 $\text{CoA}$ 和 $\text{NAD}^+$ 外, 硫胺素焦磷酸 ( $\text{TPP}$ , 图13-6)、硫辛酰胺和 $\text{FAD}$ 也是催化作用的辅助因子。

表13-2 大肠杆菌 (E.coli) 的丙酮酸脱氢酶复合物

酶	缩写	链的数目	辅基	所催化的反应
丙酮酸脱氢酶部分	A 或 E <sub>1</sub>	24	TPP	丙酮酸的脱羧
二氢硫辛酰转乙酰基酶	B 或 E <sub>2</sub>	12	硫辛酰胺	C <sub>2</sub> 单位的氧化并转移给CoA
二氢硫辛酰脱氢酶	C 或 E <sub>3</sub>	12	FAD	氧化型硫辛酰胺的再生

从丙酮酸转变为乙酰CoA共有四个步骤。第一步，丙酮酸与TPP结合后发生脱羧。这一反应是由此多酶体系中的丙酮酸脱氢酶部分所催化的。



丙酮酸脱氢酶部分的辅基TPP的一个关键性的特点就是其噻唑环中氮原子与硫原子之间的碳原子是酸性很强的。

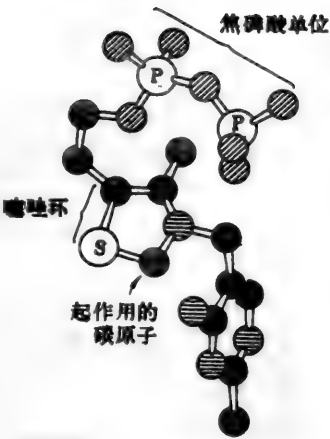
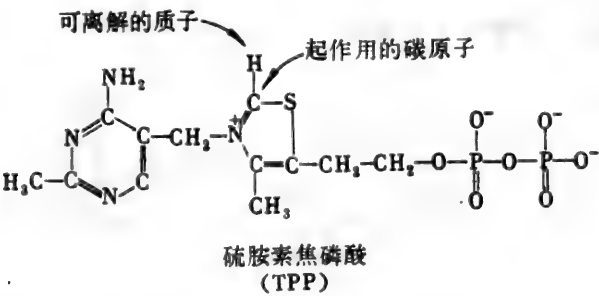
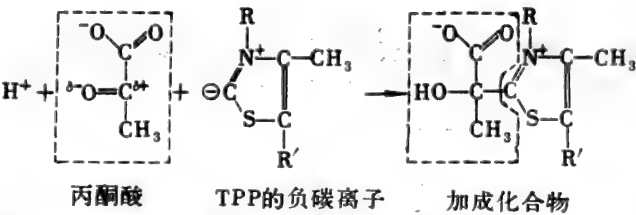


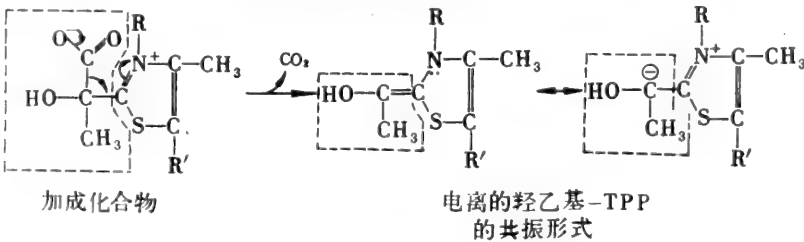
图13-6 硫胺素焦磷酸的模型。



它电离而形成负碳离子，然后又迅即与丙酮酸的羰基加成。



TPP环上带正电荷的氮然后起收藏电子的作用以使负电荷的形成稳定化，负电荷是脱羧作用所必须的。然后质子化作用产生羟乙基硫胺素焦磷酸。



第二步，连在 TPP 上的羟乙基被氧化，形成乙酰基同时又转移到硫辛酰胺(图13-7, 13-8)上。这一反应中的氧化剂是硫辛酰胺中的二硫基，它被转变成硫氢基的形式。这一反应

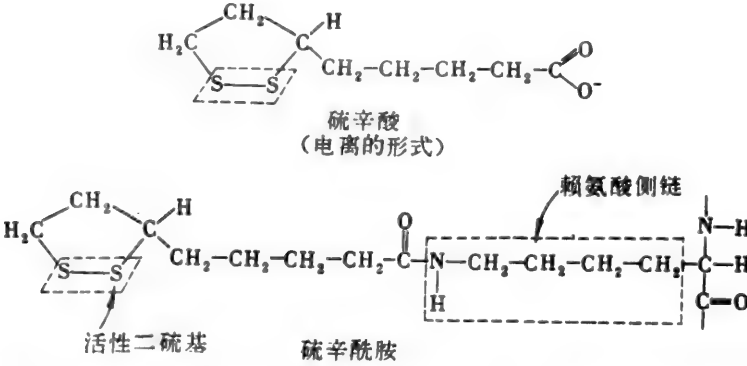


图13-7 硫辛酸和硫辛酰胺的结构式。硫辛酸以共价键与二氢硫辛酸转乙酰酶的赖氨酸侧链结合。注意这个辅基在一长而易变的链的末端，这就使得它能在酶复合物中从一个活性部位旋转到另一活性部位上去。

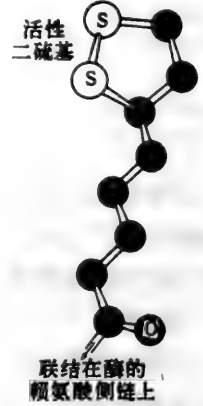
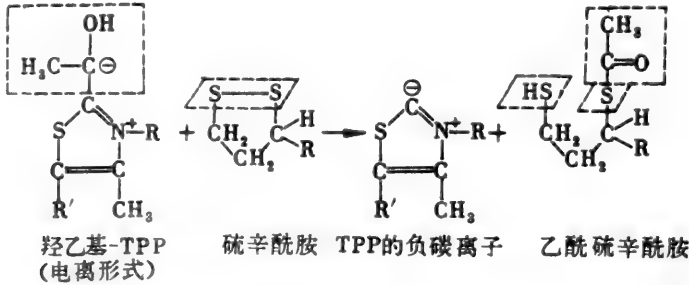
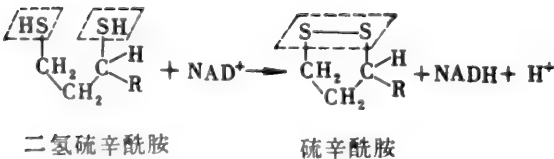
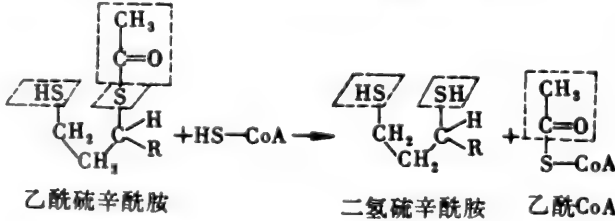


图13-8 硫辛酰胺的硫辛酰胺部分的模型。

由酶复合物的二氢硫辛酸转乙酰酶部分所催化，产生乙酰硫辛酰胺。



第三步，乙酰基从乙酰硫辛酰胺上转移到CoA上，形成乙酰CoA。二氢硫辛酸转乙酰酶也催化这一反应。当乙酰基转移到CoA上时，高能的硫酯键保留下来。



第四步，氧化型的硫辛酰胺再生出来，反应完成。这一反应中 $\text{NAD}^+$ 是氧化剂，此反应是由酶复合物中的二氢硫辛酸脱氢酶部分所催化的。FAD是这种酶的辅基。

里德, L. (Lester Reed) 的研究是深入了解丙酮酸脱氢酶复合物的结构和集合体的来源。大肠杆菌中的这种酶复合物是研究得最详尽的。其质量为4,600kda, 由48条多肽链组成。从电镜照片上可看到直径约300Å的多面体结构(图13-9)。转乙酰酶的多肽链是丙酮酸脱氢酶复合物的核心。丙酮酸脱氢酶单位和硫辛酰脱氢酶单位结合在转乙酰酶核心的外面(图13-10)。

组成这一复合物的各个多肽链是由非共价的作用力维系在一起的。在碱性pH下, 此复合物解离为一个丙酮酸脱氢酶组分和另一个由其它两种酶组成的次级复合物。然后在尿素存在下和在中性pH下, 转乙酰酶可与脱氢酶分开。在中性pH下和没有尿素时, 当这三种酶相混合时, 它们能自发地结合在一起, 形成丙酮酸脱氢酶复合物。这说明天然的酶复合物可能是由它们自身的集合过程形成的。

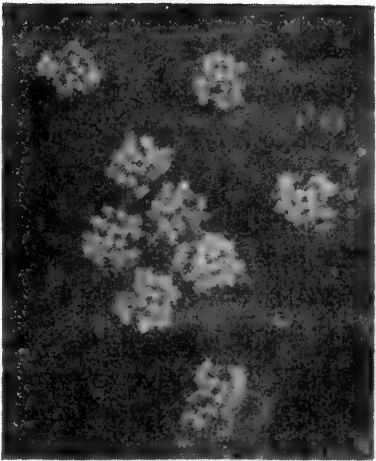


图13-9 大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶复合物的电镜照片。[蒙Dr. Lester Reed 特许。]



图13-10 大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶复合物的模型。  
[依据Dr. Lester Reed提供。]

这三种酶的结构上的整体性使得一套复杂反应的相互协调的催化作用能以进行(图13-11)。丙酮酸的氧化性脱羧的所有中间产物都是牢固地结合在这一复合物上面的。一种酶和另一种酶紧密贴近增加了总反应的速度并将副反应减至最少。有活性的中间产物是由转乙酰酶的硫辛酰胺辅基从一个活性部位转移到另一个活性部位的。硫辛酰基联结在转乙酰酶的赖氨酸残基的ε-氨基上使它成为活性环(reactive ring)的灵活的手臂。这个14Å的分子线(molecular string)使得转乙酰酶亚基的硫辛酰基部分能够既与相邻的丙酮酸脱氢酶亚基的硫胺素焦磷酸单位相互作用, 又与相邻的硫辛酰脱氢酶部分的黄素单位相互作用。其次, 多酶复合物中的硫辛酰部分也能彼此相互作用, 形成了活性基团的一种相互作用的网。在硫辛酰部分发生转变的循环时, 其净电荷为0、-1或-2, 假设硫氢基完全电离的话。净电荷的这种变化可能提供了推动力, 使得硫辛酰基能够定向地运动。

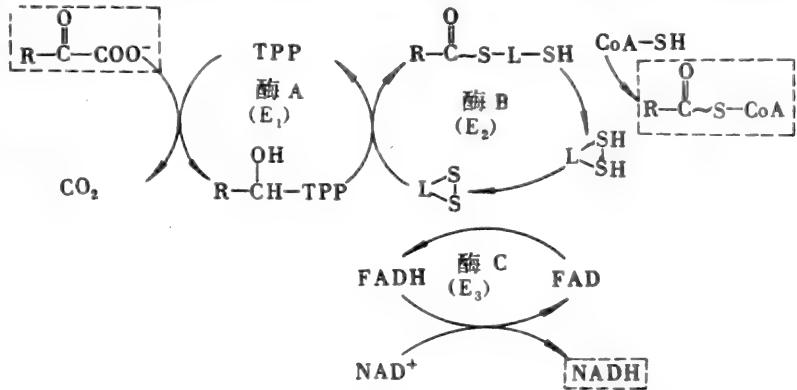
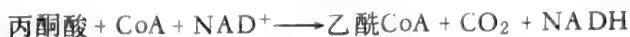


图13-11 丙酮酸脱氢酶复合物所催化各反应的概略。L代表硫辛酰基。

## 另一种多酶体系： $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物

$\alpha$ -酮戊二酸的氧化性脱羧与丙酮酸的非常相似：



有同样的辅助因子参加：T P P，硫辛酰胺，CoA，FAD和NAD<sup>+</sup>。事实上， $\alpha$ -酮戊二酸的氧化性脱羧是由一种与丙酮酸脱氢酶复合物在结构上相似的酶复合物所催化的。在 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物中也有三种酶，即 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶组分（A'），转琥珀酰酶组分（B'）和二氢硫辛酰脱氢酶组分（C'）。又是一样地，A'结合在B'上，B'结合在C'上，但是A'不直接与C'结合。因此，转琥珀酰酶（像转乙酰酶一样）是复合物的核心。

$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶组分（A'）和转琥珀酰酶（B'）与丙酮酸脱氢酶复合物中相应的酶（A和B）不同。可是这两种复合物中的二氢硫辛酰脱氢酶部分（C和C'）却是相似的。重组实验表明，由A、B和C'形成的复合物和由A、B和C形成的复合物在丙酮酸的氧化性脱羧方面活性是一样的。与此类似，在合成使 $\alpha$ -酮戊二酸氧化脱羧的复合物方面，C和C'是可以互换的。

早已注意到糜蛋白酶、胰蛋白酶、凝血酶和弹性蛋白酶是同系酶（homologous enzyme）。这里我们看到丙酮酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶是同系酶集合体。在柠檬酸循环的入口处产生协调的催化作用的结构上和机理上的办法后来又在这一循环中用上了。

## 硫胺素的缺乏引起脚气病

“一种使人烦恼和受折磨的病，当地人称为脚气病（Beri-beri原意为羊）。我相信那些受到这种疾病侵害的人，膝盖颤抖，腿抬不起来，走路像羊那样。它是一种麻痹，甚至是震颤：因为它影响到手和脚，有时甚至是全身的运动和知觉……”1630年当荷兰医生博尼图斯，J.（Jacobus Bonitus）在爪哇工作时，他这样描述脚气病。

脚气病是由饮食中缺乏硫胺素（或称维生素B<sub>1</sub>）所引起的。这种病在远东曾经是而且继续是严重的健康问题，因为主要的食物稻米中硫胺素含量相当低。如果吃白米，问题就更为严重，因为只有米的外层才含有相当量的硫胺素。大量饮酒的人偶尔也有脚气病，因为他们严重营养不良。这种病的特点是神经方面的和心脏方面的症状。外周神经受损害的表现是四肢疼痛、肌肉系统虚弱和皮肤的感觉失真。心脏可能扩大，心输出不正常。

为什么硫胺素的缺乏会造成这些病症呢？T P P是三种重要的酶的辅基。这些酶是丙酮酸脱氢酶、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶和转酮醇酶。转酮醇酶把二碳单位从一个糖上转移到另一个糖上；其在戊糖磷酸途径中的作用将在以后讨论。利用T P P的酶促反应的共同特点是转移一个活化的醛单位。脚气病患者的血液中，丙酮酸和 $\alpha$ -酮戊二酸的含量高于正常人的。输入葡萄糖后血液中丙酮酸含量的增加特别显著。另一有关的发现是体内丙酮酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的活性低得不正常。其次，脚气病患者的红血球中转酮醇酶的活性低。这些酶的测定在诊断这种疾病上是有用的。

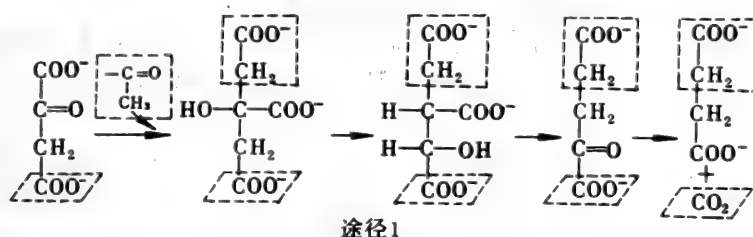


## 对称的分子可能以不对称的方式起反应

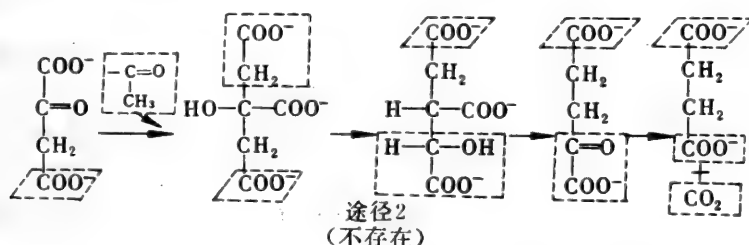
表 13-3 常用的放射性同位素

同位素	半衰期	同位素	半衰期
$^3\text{H}$	12.26年	$^{42}\text{K}$	12.36小时
$^{14}\text{C}$	5730年	$^{45}\text{Ca}$	163天
$^{22}\text{Na}$	2.62年	$^{59}\text{Fe}$	45.6天
$^{32}\text{P}$	14.28天	$^{125}\text{I}$	60.2天
$^{35}\text{S}$	87.9天	$^{203}\text{Hg}$	46.9天

让我们追踪柠檬酸循环中特定碳原子的命运。假设草酰乙酸中离酮基最远的那个羧基碳被 $^{14}\text{C}$ 所标记。分析所形成的 $\alpha$ -酮戊二酸将会证明放射性标记一点也没有丢失。 $\alpha$ -酮戊二酸的脱羧则产生没有放射性的琥珀酸。全部标记都应在所释放的 $\text{CO}_2$ 中。



所有的标记都出现在 $\text{CO}_2$ 中的发现使人惊奇。柠檬酸是一个对称的分子。人们自然会假定其中的两个 $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ 应该完全一样地发生反应。每有一个柠檬酸发生途径1所示的反应，就应该有另一个柠檬酸分子如途径2所示发生反应。如果是这样，那么应该只有一半标记出现在 $\text{CO}_2$ 中。



1941年进行的这些实验的解释是柠檬酸（或任何其它对称的化合物）不可能是形成 $\alpha$ -酮戊二酸的中间产物，因为标记的命运是不对称的。在奥格斯顿（Alexander Ogston）之前，这种解释似乎是令人非相信不可的，但奥格斯顿于1948年尖锐地指出：一个对称分子中两个完全相同的基团是无法分辨的这种假定是谬误的，“相反，有可能一个不对称的酶攻击一个对称的化合物时能分辨出两个完全相同的基团来…同位素在一个产物中的出现不对称并不能肯定地证明它是来自于一个对称的前体”。

让我们来研究奥格斯顿的主张。为简单起见，考虑一个有两个氢原子、一个基团X和另一个不同的基团Y共同连在一个四面体的碳原子上的分子。让我们使一个氢标记为A，另一个为B。现在假设有一个酶与这一底物的三个基团X、Y和H结合。H<sub>A</sub>能与H<sub>B</sub>区分开吗？图13-12表明X、Y和H<sub>A</sub>结合在酶的三个点上。注意X、Y和H<sub>B</sub>不能结合在这一活性部位上；这三个基团中有两个可以结合上去，但不能三个都结合上去。因此，H<sub>A</sub>和H<sub>B</sub>就会有不

同的命运。

应该注意到虽然分子 $CXYH_2$ 没有光学活性,但是 $H_A$ 和 $H_B$ 在立体结构上是不等的。类似地,虽然柠檬酸没有光学活性,但柠檬酸的 $-CH_2COO^-$ 基在立体结构上是不等的。决定着一个化合物是否含有不能彼此分辨开的取代基的对称规则和决定着该化合物是否有光学活性的规则是不同的:(1)一个分子若能完全与其镜像重合,它就没有光学活性;(2)只有当旋转后两个基团能重合而其余的结构又都没有变化时,一个分子才具有不能彼此分辨开的取代基。

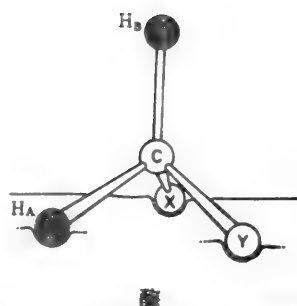


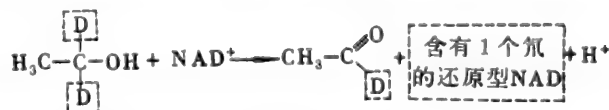
图13-12 若底物 $CXYH_2$ 有三点结合在酶上, $H_A$ 和 $H_B$ 在立体结构上是不等的。

像 $H_A$ 和 $H_B$ 这样在立体结构上不相等的基团几乎总是可以在酶促反应中被区别开的。这些基团被区分的实质是酶以一种特定的取向掌握着底物。在三个点上连接,如图13-12所示,是一种一目了然地达到这种使底物有特殊定向的方法,但不是达到此目的的唯一方法。

手性(chiral)和前手性(prochiral)这两个术语现在广泛应用于描述分子的立体化学。一个手性分子有手性,因而有光学活性。一个前手性分子,例如柠檬酸或 $CXYH_2$ 没有手性,因此没有光学活性,但是经过一步就可以变成手性的。当一个前手性分子(例如 $CXYH_AH_B$ )中两个相同的原子或基团中的一个(此例中的 $H_A$ )被取代时,它就变成手性的( $CXYZH_B$ )。R和S是用以明确表示手性或前手性中心的构型的前缀,如本章附录所述(233页)。

### $NAD^+$ -脱氢酶使氢发生立体结构上专一的转移

二十世纪五十年代,文内斯兰德, B. (Birgit Vennesland)、韦斯特海默尔, F. (Frank Westheimer) 和他们的同事们进行了一些精采的实验,就是关于 $NAD^+$ -脱氢酶使氢发生立体结构上专一的转移的实验。在C-1上有两个氘原子标记的乙醇是乙醇脱氢酶所催化的反应的底物。他们发现还原型辅酶中每分子只有一个氘原子,而另一个氘原子却在乙醛中。这样,没有一个氘进入到溶剂中,这表明氘是直接从底物上传递给了 $NAD^+$ 。



然后用这一反应中所形成的氘标记的还原型辅酶去还原乙醛。惊人的结果是所有的氘又从辅酶传递到了底物。 $NAD^+$ 再也不含有氘了。



\* 手性——“假若任何一个几何图形,或任何一组几何上的点,在理想的平面镜中的映象无法与其本身重合,我就称之为手性的(chiral)或具有手性(chirality)”。——洛德·凯尔文(Lord Kelvin)(1893)

手性源于希腊字 cheir, 意即手。

这些反应说明乙醇脱氢酶所催化的传递是立体结构上专一的。NADH (图13-13)中C-4上的两个氢原子所占据的位置是不相同的。其中的一个( $H_A$ )是在烟酰胺平面的前面,另一个( $H_B$ )在后面。换言之,C-4是前手性中心。乙醇脱氢酶是一手性试剂,它能区别C-4上A和B的位置。氘只能从氘标记的乙醇上转移到A的位置上:

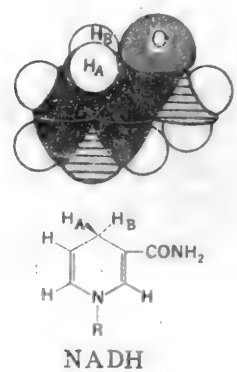
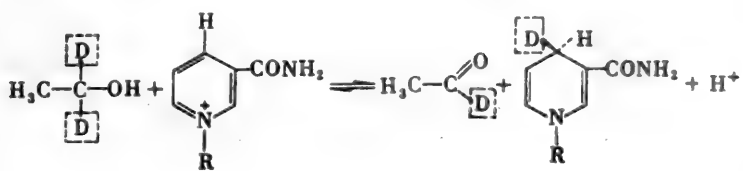


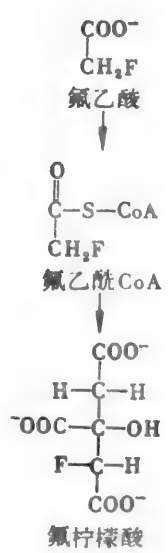
图13-13 NADH的烟酰胺部分的模型和化学式,表明 $H_A$ 和 $H_B$ 在环的相对两侧。用RS命名法, $H_A$ 为pro-R, $H_B$ 为pro-S。

在逆向反应中,位置A上的氘原子被移走并直接传递给乙醇。  
有些脱氢酶,如甘油醛磷酸脱氢酶,是将氢传递到位置B上。因此,有两类 $\text{NAD}^+$  (以及 $\text{NADP}^+$ )脱氢酶, A-立体专一的和B-立体专一的。比较 $\text{NAD}^+$ 脱氢酶的三维结构表明A类型和B类型酶立体结构专一性上的区别来源于烟酰胺环相对于相邻核糖单位的 $180^\circ$ 的旋转。这种 $180^\circ$ 旋转的结果是烟酰胺环的相对的侧面暴露出来,因而有了活性为A-类型或B-类型的脱氢酶。正如所预期的,所有已知的脱氢酶都是有立体结构专一性的。当一种脱氢酶与许多底物起反应时,氢传递的立体结构专一性都是一样的。已发现特定脱氢酶的立体结构专一性与物种无关(例如酵母和马的乙醇脱氢酶具有相同的立体结构专一性),这着重指出在演化过程中 $\text{NAD}^+$ 的结合部位是保留着的。其次,对于那些既能利用 $\text{NAD}^+$ 又能利用 $\text{NADP}^+$ 的酶,一个特定反应对于这两种辅酶的立体结构专一性是相同的。

### 致死的合成: 氟乙酸转变为氟柠檬酸

动物吃了*Dichapetalum cymosum*,南非洲的一种有毒植物的叶子,其体内的柠檬酸循环受阻。一个小时之内,许多器官中柠檬酸的含量增加到十倍以上。中毒的动物发生痉挛,通常短时间内就死亡。这些叶子中的毒物是氟乙酸,它也曾被用作毒大鼠的药。氟乙酸本身并不影响提纯的柠檬酸循环的酶。那么,为什么在引入氟乙酸后在体内会阻断柠檬酸循环呢?理由是氟乙酸会经酶促转变为氟柠檬酸,它是乌头酸的强有力的抑制剂。氟乙酸被活化成氟乙酰CoA,它又与草酰乙酸缩合形成氟柠檬酸。

乌头酸酶的活性部位含有 $\text{Fe}^{2+}$ 离子,在正常情况下它与柠檬酸的羟基中的氧和两个羧基中的氧螯合。氟柠檬酸则相反,它结合上后其氟原子与亚铁离子螯合(图13-14)。氟的高电负性使得它能与 $\text{Fe}^{2+}$ 发生强的相互作用,其结果是酶被抑制。重要的是要注意到氟乙酸转变为氟柠檬酸并非致死合成的唯一情况。许多化合物,它们本身是没有什么大害处的,但能被酶促转化为非常有害的物质。例如,有些多环的芳香烃就



能在体内被酶促修饰为强有力的诱变剂和致癌物质 (307页)

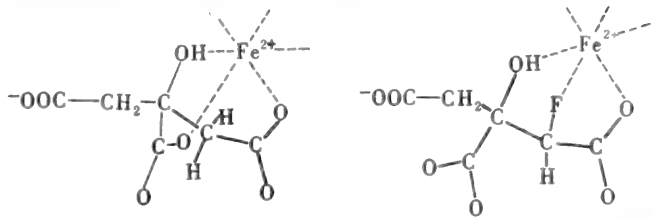


图13 14 柠檬酸和氟柠檬酸与乌头酸酶活性部位结合的假设模型: (A) 与柠檬酸结合的结果是有催化作用; (B) 与氟柠檬酸结合则有抑制作用: 氟柠檬酸的氟原子与活性部位的亚铁离子螯合。[依据Dr. Jenny Glusker 提供的图。]

### 柠檬酸循环是生物合成前体的来源

到此为止, 我们的讨论集中于柠檬酸循环是产生 **ATP** 的主要降解途径。柠檬酸循环也

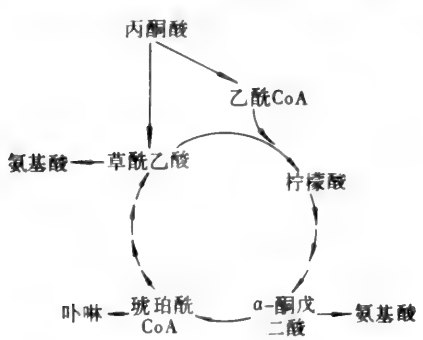


图13 15 柠檬酸循环在生物合成中的作用。由丙酮酸所形成的草酰乙酸补充生物合成取走的中间产物 (由横箭头表示)。

为生物合成提供中间产物 (图13 15)。例如, 卟啉中的大部分碳原子来自于**琥珀酰CoA**。许多氨基酸是由  $\alpha$  酮戊二酸和草酰乙酸衍生而来的。这些化合物的生物合成将在以后几章中讨论。现在要注意的要点是假若柠檬酸循环的中间产物被用于生物合成, 它们必须得到补充。假定草酰乙酸转变为氨基酸以用于蛋白质的合成。那么除非有新合成的草酰乙酸, 否则, 柠檬酸循环就会停止运转, 因为乙酰CoA若不与草酰乙酸缩合就不能进入此循环。草酰乙酸是怎样补充的呢? 哺乳动物没有把乙酰CoA转变为草酰乙酸或其它柠檬酸循环中间产物的酶机器。草酰乙酸是由丙酮酸的羧化作用形成的, 这一反应由丙酮酸羧化酶催化 (265页)。



丙酮酸的羧化作用是回补反应的一个例子(回补anaplerotic来源于希腊字, 意即“填补”)。

### 丙酮酸脱氢酶复合物的控制

由丙酮酸形成乙酰CoA是代谢中一个关键性的不可逆步骤, 因为动物不能把乙酰CoA转变为葡萄糖。丙酮酸氧化脱羧为乙酰CoA而把葡萄糖的碳原子推上了两条可能的道路: 被柠檬酸循环氧化为 $\text{CO}_2$ , 同时产生能量; 或是掺入到脂类中 (364页)。因此丙酮酸脱氢酶复合物的活性有必要受到严格的调节。事实上, 这种酶复合物受到三种方式的控制:

1. **产物抑制** 丙酮酸氧化的产物乙酰CoA和NADH抑制此酶复合物。乙酰CoA抑制其转乙酰酶组分, 而NADH抑制二氢硫辛酰脱氢酶组分。这两种抑制作用分别为CoA和 $\text{NAD}^+$ 所逆转。

2. 核苷酸的反馈调节 此酶复合物的活性为能荷（192 页）所控制。具体地说，丙酮酸脱氢酶组分为GTP 所抑制，而为AMP 所活化。还有，当细胞中立即可利用的能量多时，此复合物的活性降低。

3. 共价修饰的调节 当丙酮酸脱氢酶组分的专一的丝氨酸残基被 ATP 磷酸化时，此复合物的酶失活。ATP/ADP, 乙酰CoA/CoA和NADH/NAD<sup>+</sup>的比值高时磷酸化被促进，而丙酮酸则抑制磷酸化。当磷酸基被一种专一的磷酸酶水解时，酶复合物又恢复其活性。高水平的丙酮酸促进脱磷酸作用。共价修饰是控制酶活性的重要机理。当我们讨论糖原的合成和降解时会再次遇到作为控制性反应的磷酸化作用和脱磷酸作用。

### 柠檬酸循环的控制

柠檬酸循环的速率也受到精确调节，以满足细胞对于ATP 的需要。循环中由草酰乙酸和乙酰CoA合成柠檬酸的反应是一个重要的控制点。ATP 是柠檬酸合成酶的变构抑制剂。ATP 的作用是对于乙酰CoA的K<sub>M</sub>。比如，当ATP 的水平增加时，有较少的酶为乙酰CoA所饱和，因而合成的柠檬酸就较少。

第二个控制点是异柠檬酸脱氢酶。这种酶受到ADP的变构促进，这又增大了它对底物的亲和力。与异柠檬酸、NAD<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和ADP的结合是相互配合的。反之，NADH由于直接取代了NAD<sup>+</sup>而抑制异柠檬酸脱氢酶。

柠檬酸循环中的第三个控制部位是α-酮戊二酸脱氢酶。其控制的某些方面与丙酮酸脱氢酶复合物的控制相似，这从它们在结构上的同系性就可以推测到。α-酮戊二酸脱氢酶为它所催化的反应的产物，即琥珀酰CoA和NADH所抑制。还有，α-酮戊二酸脱氢酶也为高的能荷所抑制。简言之，当细胞中 ATP 含量高时，二碳片段进入柠檬酸循环和循环的速率都减慢了。这种控制是在几个部位由不同的互为补充的机理所完成的（图13-16）。



图13-16 柠檬酸循环和丙酮酸的氧化性脱羧的控制：□表示需要电子受体（NAD<sup>+</sup>或FAD）的步骤，电子受体是在呼吸链中再生的。

### 克雷布斯对于柠檬酸循环的发现

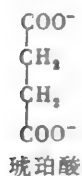
“常有人问我关于三羧酸循环的工作是怎样开始和怎样发展的。也许这种概念来自于一时的灵感和幻想？”克雷布斯,H.的回答是“当然完全不是这样,它是一个非常缓慢的演化过程,从1932年（那时我参与了这项工作）起经过了大约五年的时间。”克雷布斯首先用肾脏和肝脏切片研究了许多种化合物的氧化速率。所选择的物质是那些预期它们可能是食物氧化的中间产物的化合物。这些实验背后的想法是这类中间产物应该氧化得很快，因而可以鉴定出什么是中间产物。重要的发现是柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸和乙酸是在各种不同的组织中氧化

得最快的。

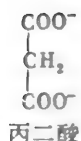
1935年圣-乔治, A. (Albert Szent Györgyi) 作出了关键性的贡献。他利用绞碎的鸽子胸肌的悬液研究了各种不同物质的氧化。这种非常活跃的飞翔肌肉的氧化速率特别高, 这有利于实验研究。圣-乔治发现加入某些 $C_4$ 二羧酸使耗 $O_2$ 量大大增加, 远远超过它们直接氧化所导致的耗氧量。换言之, 它们对耗 $O_2$ 量产生一种催化性的 (而不是符合化学计算关系的) 增益作用。用琥珀酸、延胡索酸和苹果酸可以得到这种对呼吸作用的催化性的刺激作用。

下一个突破是1937年马提乌斯(Carl Martius)和克努普, F. (Franz Knoop) 关于柠檬酸生物氧化途径的阐明。他们证明柠檬酸通过顺-乌头酸而被异构化为异柠檬酸, 而后异柠檬酸再氧化脱羧为 $\alpha$ -酮戊二酸。在此之前已知 $\alpha$ -酮戊二酸能被氧化为琥珀酸。这样, 他们的发现

揭示了从柠檬酸到琥珀酸的途径。这一发现来得正是时候, 它使得克雷布斯能够解释最近的观察, 即柠檬酸催化性地促进绞碎的鸽子胸肌的呼吸作用。



另一项重要的情报来自于丙二酸的使用, 丙二酸是琥珀酸脱氢酶的专一的抑制剂。丙二酸是这种酶的竞争性抑制剂, 因为它与琥珀酸极为相似。有些时候曾有人认为丙二酸毒害呼吸作用。克雷布斯推论说, 因此琥珀酸脱氢酶在呼吸作用中一定起着关键的作用。后来的发现加强了这个观点, 这个发现是: 为丙二酸所毒害的肌肉在加有柠檬酸时会积累琥珀酸。而且, 当延胡索酸加入为丙二酸所毒害的肌肉时, 琥珀酸也会积累。上述实验中的第一个证明从柠檬酸到琥珀酸的途径在生理上是重要的。第二个实验揭示了从延胡索酸到琥珀酸的另一条途径, 它不同于琥珀酸脱氢酶所催化的反应。



后来克雷布斯又发现若向肌肉悬液中加入草酰乙酸, 柠檬酸就会迅速形成。

克雷布斯又发现柠檬酸是由草酰乙酸和一种来自丙酮酸或乙酸的物质合成的, 这使得他能提出一个完整的方案。他所提出的三羧酸循环一下子就提供了碳水化合物如何被氧化的完美的图景。许多实验事实, 例如琥珀酸和其它中间产物催化性地促进呼吸作用, 都得到了完满的解释。值得注意的是柠檬酸循环并不是克雷布斯所发现的唯一的、或第一个代谢循环。六年以前, 他已证明尿素是通过一个称为鸟氨酸循环 (第 18 章) 的环式代谢途径合成的。因此, 当克雷布斯研究已有资料并设计实验时, 他已充分确定了环式代谢途径的概念了, 他所设计的实验导致了柠檬酸循环的提出。

## 概 要

柠檬酸循环是燃料分子氧化的最后的共同途径。它也是生物合成的建造基石的来源。许多种燃料分子以乙酰CoA的形式进入此循环。糖酵解与柠檬酸循环之间的纽带就是丙酮酸的氧化脱羧, 形成乙酰CoA。这一反应和柠檬酸循环的那些反应都发生在线粒体内, 而与糖酵解不同, 糖酵解发生在细胞溶质中。此循环开始于草酰乙酸 ( $C_4$ ) 与乙酰CoA ( $C_2$ ) 的缩合, 产生柠檬酸 ( $C_6$ ), 柠檬酸又异构化为异柠檬酸 ( $C_6$ )。这一中间物的氧化脱羧产生 $\alpha$ -酮戊二酸 ( $C_5$ )。在下一反应中放出第二个 $CO_2$ 分子,  $\alpha$ -酮戊二酸氧化脱羧为琥珀酰CoA ( $C_4$ )。琥珀酰CoA中的硫酯键被 $PI$ 裂解, 产生琥珀酸, 同时产生一高能磷酸键, 其形式为GTP。琥珀酸被氧化为延胡索酸 ( $C_4$ ), 此酸又被水合, 形成苹果酸 ( $C_4$ )。最后, 苹果酸被氧化, 再生出草酰乙酸 ( $C_4$ )。这样, 来自乙酰CoA的两个碳原子进入此循环, 随后又通过异柠檬

酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶所催化的先后两个脱羧反应使两个碳原子作为 $\text{CO}_2$ 离开此循环。在这个循环中的四个氧化-还原反应中,有三对电子转移给 $\text{NAD}^+$ ,一对转移给 $\text{FAD}$ 。这些还原态的电子载体随后又被电子传递链氧化,产生11个分子 $\text{ATP}$ 。此外,在柠檬酸循环中还直接形成一个高能磷酸键。因此,每一个两碳的片段被完全氧化成 $\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CO}_2$ ,总共产生12个高能磷酸键。

柠檬酸循环只有在有氧条件下运转,因为它需要 $\text{NAD}^+$ 和 $\text{FAD}$ 的供应。当 $\text{NADH}$ 和 $\text{FADH}_2$ 把它们的电子传递给 $\text{O}_2$ 时,这些电子载体会再生,这种传递是通过电子传递链进行的,同时产生 $\text{ATP}$ 。当然,柠檬酸循环的速率决定于对 $\text{ATP}$ 的需要。此循环中三种酶的调节对于环的控制也是重要的。高的能荷降低柠檬酸合成酶、异柠檬酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的活性。由丙酮酸不可逆地形成乙酰 $\text{CoA}$ 是另一个重要的调节部位。丙酮酸脱氢酶复合物的活性是由产物的抑制、核苷酸的反馈调节和共价修饰所控制的。当细胞的能荷高时,这些机理相互补充以降低形成乙酰 $\text{CoA}$ 的速率。

### 附录：手性的RS表示法

应用卡恩, R. (Robert Cahn)、英格尔德, C. (Christopher Ingold) 和普利洛格, V. (Vladimir Prelog) 于1956年提出的RS表示法可以明确无误地规定任何手性中心的绝对构型。考虑一手性化合物 $\text{CHFClBr}$  (图13-17A)。应用RS表示法的第一步是指定四个取代基的优先顺序,其原则是原子序数高的原子比原子序数低的原子更为优先。因此,这四个取代基的先后顺序为:(a) Br, (b) Cl, (c) F, (d) H; Br最为优先(a)。第二步是旋转这个分子,使那个优先性最差的取代基(d)离观察者最远。对于 $\text{CHFClBr}$ ,这意味着必须把分子转动到H离开我们(在图13-17B中纸平面的背后)。最后一步是问一问从a到b到c的途径在这种情况下是顺时针方向的还是反时针方向的。如果它是顺时针的(右手的),那么构型就是R (来源于拉丁文rectus,即右)。如果它是反时针方向的(左手的),构型就是S (来源于拉丁文sinister,左)。图13-17中所示的 $\text{CHFClBr}$ 的立体异构体的构型是R。

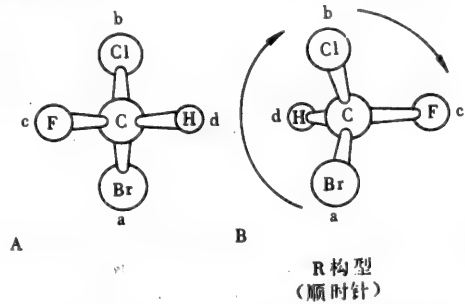


图13-17 图中所示 $\text{CHFClBr}$ 的立体异构体为R构型。

现在让我们来看丙氨酸的RS表示法 (图13-18A)。与 $\alpha$ -碳原子成键的四个原子是N, C, C和H。甲基碳和羧基碳的优先性是由与碳相连的一组原子所决定的。注意一下生物化学上重要基团的优先性的顺序是有用的:  $-\text{SH}$  (最高),  $-\text{OR}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOR}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{T}$ ,  $-\text{D}$ ,  $-\text{H}$  (最低)。所以,连在丙氨酸的 $\alpha$ -碳上的四个基团的先后顺序是:(a)  $-\text{NH}_3^+$ , (b)  $-\text{COO}^-$ , (c)  $-\text{CH}_3$ , (d)  $-\text{H}$ 。下一步就是将L-丙氨酸旋转使优先性最差的基团( $-\text{H}$ )在纸平面的后面 (图13-18B)。从(a)  $-\text{NH}_3^+$ 到(b)  $-\text{COO}^-$ 再到(c)  $-\text{CH}_3$ 的途径是反时针方向的(左手的),所以L-丙氨酸是S构型。

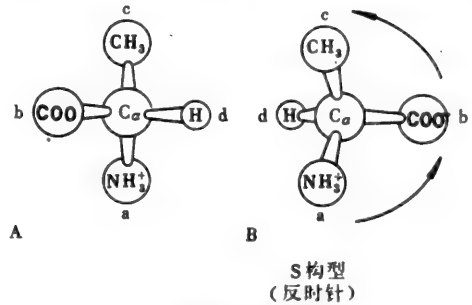
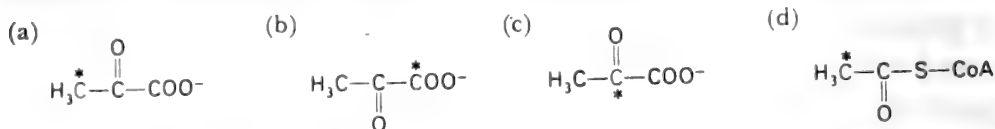


图13-18 L-丙氨酸是S构型。

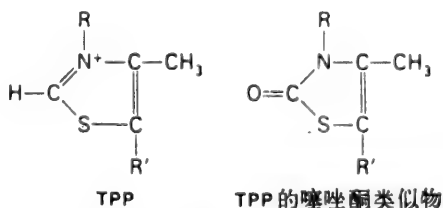
## 习 题

1. 当下列各化合物分别加于含有糖酵解途径、柠檬酸循环和丙酮酸脱氢酶复合物的酶及辅助因子的细胞提取物中时，其放射性标记的命运如何？（ $^{14}\text{C}$  标记用星号表示）。



(e) C-1上标记的葡萄糖 6-磷酸。

- 将乙酰CoA加于一含有柠檬酸循环的酶和辅助因子的提取物中时，能否得到草酰乙酸的净合成？
- 平衡时柠檬酸、异柠檬酸和顺-乌头酸的相对浓度是多少？（利用表13-1的数据）。
- 乙酰CoA中的乙酰单位通过柠檬酸循环氧化的 $\Delta G^{\circ'}$ 是多少？
- 将 $\text{H}_3\text{C}-\text{CD}_2-\text{OH}$ 和 $\text{NAD}^+$ 与乙醇脱氢酶共同保温制备了氘标记的还原型NAD的样品。将这种还原型辅酶加到1,3-DPG和甘油醛3-磷酸脱氢酶的溶液中。这第二个反应所形成的 $\text{NAD}^+$ 含有一个原子氘，而另一产物甘油醛3-磷酸却不含氘。关于甘油醛3-磷酸脱氢酶的立体异构专一性，这一实验说明了什么？
- 硫胺素噻唑酮焦磷酸与丙酮酸脱氢酶的结合大约比硫胺素焦磷酸的结合强20,000倍，它对此酶发生竞争性抑制作用。为什么？



7. 在标准状况下苹果酸被 $\text{NAD}^+$ 氧化形成草酰乙酸是一强吸能反应（ $\Delta G^{\circ'} = +7\text{kcal/mol}$ ）。在生理条件下这一反应极易由苹果酸向草酰乙酸的方向进行，因为产物的稳态浓度比底物的要低得多。假定 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ 之比为8，pH为7，能够由苹果酸形成草酰乙酸的 $[\text{苹果酸}]/[\text{草酰乙酸}]$ 最低的比值是多少？

另外的习题，参看W. B. Wood, J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 10.



## 第14章 氧化磷酸化作用

糖酵解、脂肪酸氧化和柠檬酸循环中所形成的  $\text{NADH}$  和  $\text{FADH}_2$  都是高能分子,因为它们都带有一对转移势高的电子。当这些电子转移到分子态氧时,有大量的能释放出来。这些释放出的能可用于产生  $\text{ATP}$ 。氧化磷酸化就是一个形成  $\text{ATP}$  的过程,它是当电子经过一系列电子载体从  $\text{NADH}$  或  $\text{FADH}_2$  传递给  $\text{O}_2$  时发生的。这是需氧生物中  $\text{ATP}$  的主要来源。例如,当葡萄糖完全被氧化为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  时所形成的36个  $\text{ATP}$  中,就有32个是由氧化磷酸化产生的。这一过程的基本特征是:

1. 氧化磷酸化是由位于线粒体内膜中的呼吸酶集合体完成的。供应大部分  $\text{NADH}$  和  $\text{FADH}_2$  的柠檬酸循环和脂肪酸氧化途径是在相邻的线粒体间质中进行的。

2.  $\text{NADH}$  的氧化产生 3 个  $\text{ATP}$ , 而  $\text{FADH}_2$  的氧化产生 2 个  $\text{ATP}$ 。氧化作用和磷酸化作用是偶联的过程。

3. 呼吸酶集合体含有许多电子载体,例如细胞色素类。电子从  $\text{NADH}$  或  $\text{FADH}_2$  通过这些载体一步一步地传递到  $\text{O}_2$  的结果,质子由线粒体间质中被泵出来并产生一膜电位(质子移动力)。质子是由三种电子传递复合物泵出的。当质子通过一种酶复合物流回到线粒体间质中时,  $\text{ATP}$  被合成。因此,氧化作用和磷酸化作用是由一种跨越线粒体内膜的质子梯度偶联起来的。

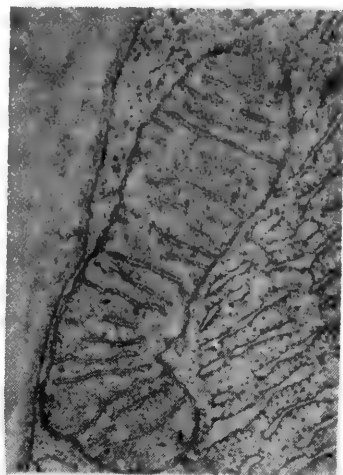


图14-1 线粒体的电镜照片。[蒙 Dr. George Palade 特许。]

### 氧化磷酸化发生在线粒体中

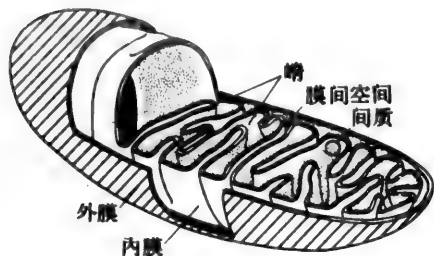


图14-2 线粒体示意图。[依据 *Biology of the Cell* by Stephen L. Wolfe © 1972 by Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont, California 94002. Adapted by permission of the publisher.]

线粒体是卵形的细胞器,典型的长约  $2\mu\text{m}$ , 直径约  $0.5\mu\text{m}$ 。二十世纪四十年代末设计了分离线粒体的技术。肯尼迪, E. (Eugene Kennedy) 和列宁格 (Albert Lehninger) 随后就发现线粒体含有呼吸酶集合体、柠檬酸循环的酶和脂肪酸氧化的酶。帕拉德 (George Palade) 和肖斯特兰德 (Fritjof Sjostrand) 用电子显微镜进行研究,揭示了线粒体所具有的两个膜系统: 一个外膜和一个广泛的、高度折叠的内膜。内膜折成一系列内部的折边,称为嵴。因此,线粒体中有两个区域: 一个是内膜和外膜之间的膜间空间,另一个是由内膜所包被的间质(图14-2)。

呼吸作用——一种产生  $\text{ATP}$  的过程。在此过程中一种无机化合物(如  $\text{O}_2$ ) 是最终电子受体,电子供体可能是有机化合物或无机化合物。

呼吸酶集合体是线粒体内膜的不可分割的部分，而柠檬酸循环和脂肪酸氧化的大部分反应都在间质中发生。

外膜对大多数小分子和离子的通透性都很大。但内膜却相反，实质上几乎所有的离子和大多数不带电荷的分子都不能透过它。有专门的蛋白质载体转运像ADP和长链脂肪酸这样的分子使它们穿过线粒体内膜。

### 氧化还原电势和自由能的变化

在氧化磷酸化作用中，NADH或FADH<sub>2</sub>的电子转移潜势转变为ATP中磷酸根转移潜势。

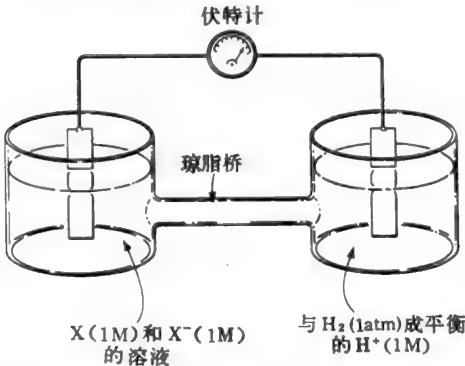


图14-3 测量一氧化还原电对的标准氧化还原电势的装置。

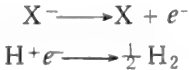
我们需要定量表示这些形式的自由能。磷酸根转移潜势的度量是我们已经熟悉的，那就是磷酸化合物水解的 $\Delta G^{\circ'}$ 。电子转移潜势的相应表示法就是 $E^{\circ}$ ，氧还电势（或称氧化还原电势）。

氧还电势是一种电化学的概念。考虑一种物质，它既能以氧化态X又能以还原态X<sup>-</sup>而存在。这一对称为氧还电对（图14-3）。这一电对的氧还电势可以测定，即测定一个样品半电池相对于一个标准参比半电池所产生的电动势。样品半电池是一个插在1mol/L氧化剂(X)和1mol/L还原剂(X<sup>-</sup>)溶液中的电极组成的。

标准的参比半电池是一个插在1mol/L H<sup>+</sup>溶液中的电极，这一溶液是与1大气压的H<sub>2</sub>气成平衡的。两个电极连在伏特计上，半电池之间电流是通过琼脂桥而连通的。于是电子从一个半电池流向另一个半电池。如果反应依下列方向进行



那么半电池中的反应就是：



这样，电子从样品半电池流到标准参比半电池，其结果与标准电池的电极相比，样品电池的电极是负的。X : X<sup>-</sup>电对的氧还电势就是实验开始时所观察到的电压（开始时X，X<sup>-</sup>和H<sup>+</sup>都是1mol/L）。根据定义，H<sup>+</sup> : H<sub>2</sub>电对的氧还电势为0V。

现在氧还电势的意义就明确了。负的氧还电势意味着该物质与电子的亲合力比H<sub>2</sub>的低，如上例。正的氧还电势意味着该物质与电子的亲合力比H<sub>2</sub>的高。这些比较都是就标准状况而言的，即1mol/L氧化剂，1mol/L还原剂，1mol/L H<sup>+</sup>和1大气压的H<sub>2</sub>。因此，强还原剂（如NADH）的氧还电势为负，而强氧化剂（如O<sub>2</sub>）的氧还电势为正。

已知许多生物学上重要的氧化还原电对的氧还电势（表14-1）。一个氧化还原反应的自由能变化很容易根据反应物的氧还电势之差计算出来。例如，考虑丙酮酸被NADH还原：



NAD<sup>+</sup> : NADH电对的氧还电势为-0.32V，而丙酮酸 : 乳酸电对的为-0.19V。按照惯例，

氧还电势是下列部分反应的：氧化剂 + e<sup>-</sup> → 还原剂。因此，



从反应(b)减去反应(c)即得到欲求出的反应(a)，而ΔE<sub>0</sub>'为+0.13V。现在我们可以计算NADH还原丙酮酸的ΔG°'。标准自由能变化ΔG°'与氧还电势变化ΔE<sub>0</sub>'的关系为：

$$\Delta G^{\circ'} = -nF\Delta E_0'$$

式中n为所传递的电子数，F为法拉第的卡当量(23.062kcalV<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>)，ΔE<sub>0</sub>'的单位为V，ΔG°'的单位为kcal/mol。丙酮酸还原时，n = 2，所以

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -2 \times 23.062 \times 0.13 \\ &= -6 \text{ kcal/mol}\end{aligned}$$

注意正的ΔE<sub>0</sub>'表示在标准状况下是放能反应。

表 14-1 某些反应的标准氧化还原电势

氧 化 剂	还 原 剂	n	E <sub>0</sub> ' (V)
α 酮戊二酸	琥珀酸 + CO <sub>2</sub>	2	-0.67
乙酸	乙醛	2	-0.60
铁氧还蛋白 (氧化型)	铁氧还蛋白 (还原型)	1	-0.43
2H <sup>+</sup>	H <sub>2</sub>	2	-0.42
NAD <sup>+</sup>	NADH + H <sup>+</sup>	2	-0.32
NADP <sup>+</sup>	NADPH + H <sup>+</sup>	2	-0.32
硫辛酸 (氧化型)	硫辛酸 (还原型)	2	-0.29
谷胱甘肽 (氧化型)	谷胱甘肽 (还原型)	2	-0.23
乙醛	乙醇	2	-0.20
丙酮酸	乳酸	2	-0.19
延胡索酸	琥珀酸	2	0.03
细胞色素b (+3)	细胞色素b (+2)	1	0.07
脱氢抗坏血酸	抗坏血酸	2	0.08
泛醌 (氧化型)	泛醌 (还原型)	2	0.10
细胞色素c (+3)	细胞色素c (+2)	1	0.22
Fe (+3)	Fe (+2)	1	0.77
½ O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	2	0.82

注：E<sub>0</sub>'为标准氧化还原电势 (pH 7, 25℃)，n为所传递的电子数。E<sub>0</sub>'是指下列部分反应的：  
氧化剂 + e<sup>-</sup> → 还原剂

呼吸链的范围是1.14伏，相当于53千卡

氧化磷酸化的推动力是NADH和FADH<sub>2</sub>的电子转移潜势。让我们计算NADH被O<sub>2</sub>氧化的ΔE<sub>0</sub>'和ΔG°'。有关的部分反应是



由反应(a)减去反应(b)得



于是这一氧化反应的自由能变化是：

$$\Delta G^{\circ'} = -nF\Delta E_0' = -2 \times 23.062 \times 1.14$$

$$= -52.6 \text{ kcal/mol}$$

黄素、铁硫、醌和血红素基团把电子从NADH带到O<sub>2</sub>

电子是通过一系列电子载体而从NADH传到O<sub>2</sub>，这些载体是：黄素、铁硫复合物、醌类和血红素类（图14-4）。这些电子载体，除醌类外，都是蛋白质的辅基。第一个反应是NADH被**NADH-Q还原酶**（也叫作**NADH脱氢酶**）所氧化，这种酶由至少16条多肽链组成。两个电子由NADH传递到这种酶的**黄素单核苷酸**（FMN）辅基，使之成为还原型，FMNH<sub>2</sub>。

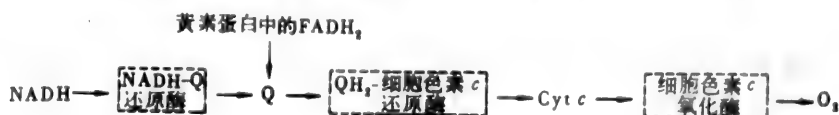
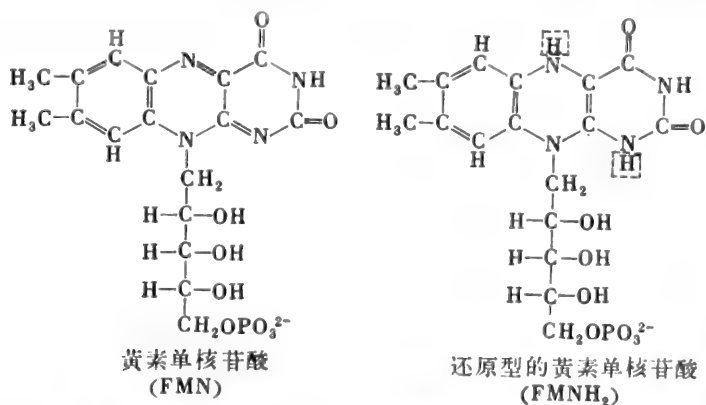


图14-4 呼吸链集合体中电子载体的顺序。质子是由三个复合物泵出的。



然后电子又由FMNH<sub>2</sub>传递到一系列铁硫复合物（缩写为FeS），这是NADH-Q还原酶中第二种类型的辅基。这里的铁不是血红素基团的一部分，所以铁硫蛋白也称为**非血红素铁蛋白**。



近年来的研究发现 FeS复合物在生物体系的许许多多氧化还原反应中都起着关键性的作用。已知有三种类型的 FeS中心（图14-5）。最简单的一种是单个铁原子以四面体的形式与蛋白

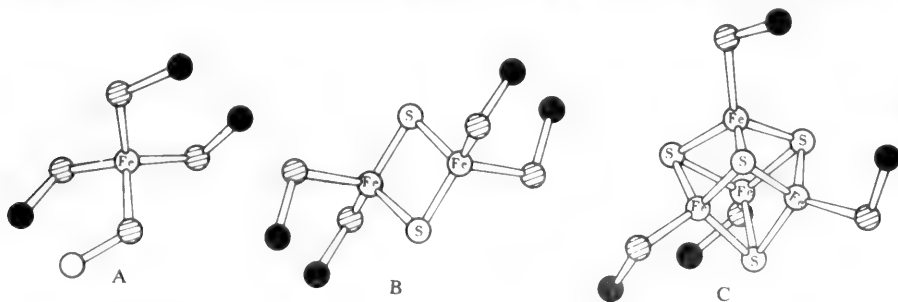


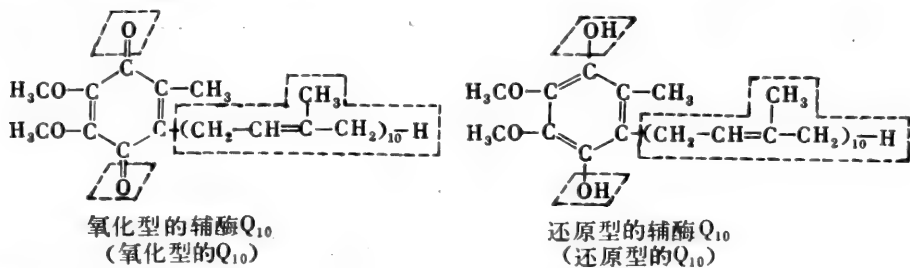
图14-5 铁硫复合物的分子模型（A）FeS中心；（B）Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>中心；（C）Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>中心。铁原子和无机硫原子已分别标出，半胱氨酸硫原子上加斜线。[依据 Jeremy Berg提供的模型画出]

质的四个半胱氨酸残基的硫氢基相配位。第二种，符号为  $(Fe_2S_2)$ ，含有两个铁原子和两个无机硫根，还有四个半胱氨酸残基。第三种类型的复合物以  $(Fe_4S_4)$  表示，含有四个铁原子、四个无机硫根和四个半胱氨酸。这些FeS复合物中的铁原子可以是 $Fe^{2+}$ （还原态）或 $Fe^{3+}$ （氧化态）两种状态。NADH-Q还原酶含有  $(Fe_2S_2)$  和  $(Fe_4S_4)$  两种类型的复合物。

然后电子由NADH-Q还原酶的铁硫中心传递给**辅酶Q**（缩写为Q）。



**辅酶Q**是一种醌的衍生物，有一个长的类异戊二烯的尾。它也称为**泛醌**，因为它广泛分布于生物体系中。Q中异戊二烯单位的数目因物种而异。哺乳动物体内最常见的形式是含有十个



异戊二烯单位的，因此其符号为 $Q_{10}$ 。类异戊二烯的尾使得Q的非极性很强，这又使得它能够在线粒体内膜的碳氢相中迅速扩散。辅酶Q是呼吸链中唯一的与蛋白质紧密结合或以共价与蛋白质联结的电子载体。事实上，**Q**的作用是一种非常活动的电子载体，它在电子传递链的**黄素蛋白**和**细胞色素**之间运动。

回忆一下，在柠檬酸循环中当琥珀酸被琥珀酸脱氢酶氧化为延胡索酸时有 $FADH_2$ 形成。这种酶是**琥珀酸-Q还原酶**复合物的两个组分之一，另一组分是FeS蛋白。这种复合物，也像NADH-Q还原酶一样，是线粒体内膜不可分割的一部分。琥珀酸脱氢酶组分中 $FADH_2$ 的高势能电子先传递给此复合物中的FeS中心，然后再传递给Q以进入电子传递链。同样，甘油磷酸脱氢酶（246页）和脂肪酰CoA脱氢酶（296页）也把它们的高势能电子传递给Q，形成其还原态 $QH_2$ 。

$QH_2$ 和 $O_2$ 之间的电子载体，除去一个FeS蛋白外，都是**细胞色素类**。细胞色素类在呼吸作用中的中心地位是1925年凯林，D. (David Keilin) 发现的。**细胞色素**是一种传递电子的蛋白质，它含有**血红素辅基**。在电子传递过程中细胞色素中的铁原子在还原的亚铁状态（+2）和氧化的高铁状态（+3）之间反复变动。血红素基团和FeS中心一样，是一电子的载体，而与NADH、黄素和Q不同，它们都是两电子的载体。因此，一个 $QH_2$ 分子，即醌的还原型，要将它的两个高能电子传递给两个细胞色素b分子，b是电子传递链中的下一个成员。半醌的自由基（以 $QH\cdot$ 表示）可能在这种传递中是一个中间体。

电子传递链中在 $QH_2$ 和 $O_2$ 之间共有五种细胞色素。细胞色素b和 $c_1$ ，加上一种FeS蛋白，是 **$QH_2$ -细胞色素c还原酶**复合物中的组分。细胞色素c将电子从这一复合物传递给**细胞色素c氧化酶**复合物，此复合物含有细胞色素a和 $a_3$ 。这些细胞色素的氧还电势（对电子的亲

和力或氧化能力) 依次增加:



这些细胞色素有独特的结构和性质。细胞色素*b*、*c*<sub>1</sub>和*c*的辅基都是铁 原卟啉Ⅸ,通常称为**血红素**,它和肌红蛋白和血红蛋白中的辅基是一样的。在细胞色素*b*中,血红素并不与蛋白质以共价结合,但在细胞色素*c*和*c*<sub>1</sub>中,血红素是通过硫醚键与蛋白质以共价相结合的(图14-6)。

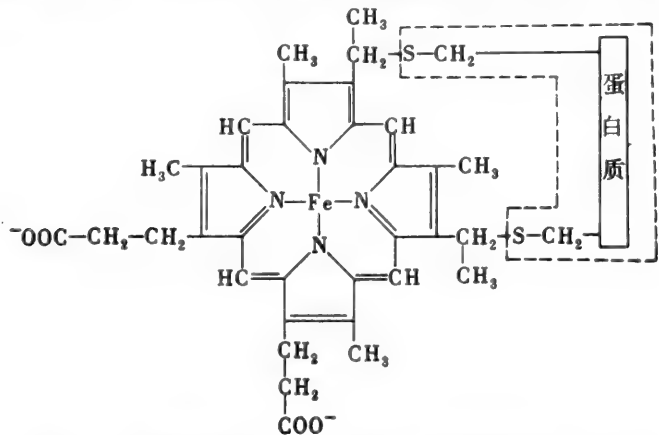
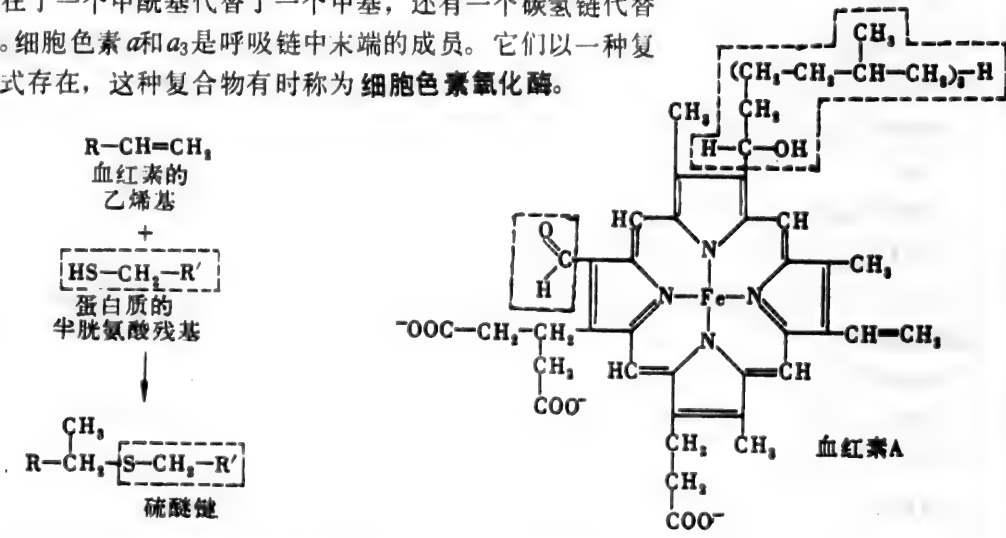


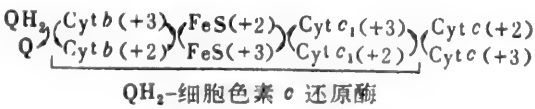
图14-6 在细胞色素*c*和*c*<sub>1</sub>中血红素与两个半胱氨酸侧链以共价结合

这些键是由两个半胱氨酸残基的巯基和血红素的乙烯基相加成而形成的。

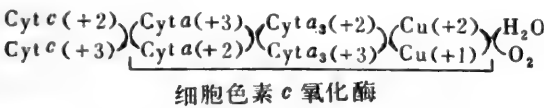
细胞色素*a*和*a*<sub>3</sub>具有不同的铁卟啉辅基,称为**血红素a**。它与细胞色素*c*和*c*<sub>1</sub>中的血红素的不同之处在于一个甲酰基代替了一个甲基,还有一个碳氢链代替了乙烯基。细胞色素*a*和*a*<sub>3</sub>是呼吸链中末端的成员。它们以一种复合物的形式存在,这种复合物有时称为**细胞色素氧化酶**。



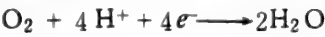
**QH<sub>2</sub>-细胞色素*c*还原酶复合物**把电子从QH<sub>2</sub>传递给细胞色素*c*,一种水溶性的在膜表面的蛋白质(见249—251页)。



然后还原型的细胞色素 *c* 又把它电子传递给细胞色素 *c* 氧化酶 (图 14-7) 复合物。细胞色素 *c* 的作用和辅酶 Q 的作用相似: 它是呼吸链中不同复合物之间游动的电子载体。

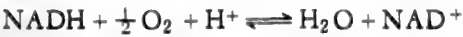


电子先传递到复合物的细胞色素 *a* 部分, 再传递给细胞色素 *a<sub>3</sub>*, 它含有铜。当它把电子从细胞色素 *a<sub>3</sub>* 传递给分子态氧时, 这个铜原子在 + 2 的氧化型和 + 1 的还原型之间反复变化。水的形成是一个四电子的过程, 而血红素基却是一电子的载体。还不知道四个电子是怎样聚合到一起还原分子态氧的。

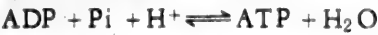


### 氧化作用和磷酸化作用 由质子梯度偶联起来

到此为止, 我们考虑的是电子从 NADH 流到  $\text{O}_2$  这一放能过程:



这一氧化作用的自由能是用来合成 ATP 的。



ATP 的合成是由线粒体内膜中的一套分子完成的。这一酶复合物 (245 页) 称为线粒体的 ATP 酶, 因为它是因它催化的水解反应而被发现的。

NADH 的氧化是怎样和 ADP 的磷酸化作用偶联起来的呢? 最初有人提出电子传递导致一种共价的高能中间产物的形成, 这种中间产物则是 ATP 的前体。这种化学偶联假说的根据是底物水平磷酸化的机理, 例如甘油醛 3-磷酸脱氢酶反应中那样, 1,3-DPG 是高能中间产物 (210 页)。另一种建议是氧化作用的自由能聚集在一种活化的蛋白质的构象中, 随后这种构象再推动 ATP 的合成。许多实验室中的研究工作者曾试验了几十年, 企图分离这些令人神往的高能中间产物, 但是一个也没有找到。

1961 年米切尔, P. (Peter Mitchell) 提出了一个根本不同的机理, 化学渗透假说。他提出电子传递和 ATP 的合成是由一种质子梯度偶联起来的, 而不是由共价的高能中间产物或活化的蛋白质偶联起来的。根据这一模型, 电子通过呼吸链传递的结果是把质子从间质泵到线粒体内膜的细胞质一侧。细胞质一侧的  $\text{H}^+$  浓度变高, 并且产生了一种膜电势, 细胞质一侧为正 (图 14-8)。据假定, 这种质子移动力推动 ATP 酶复合物合成 ATP。在这一模型中, 电子传递链和合成 ATP 的复合物只是通过膜电势相互作用。这个模型要求呼吸链中的电子载体和 ATP 酶是定向地组织起来的——也就是说, 它们的取向必须对着线粒体内膜的两个面。

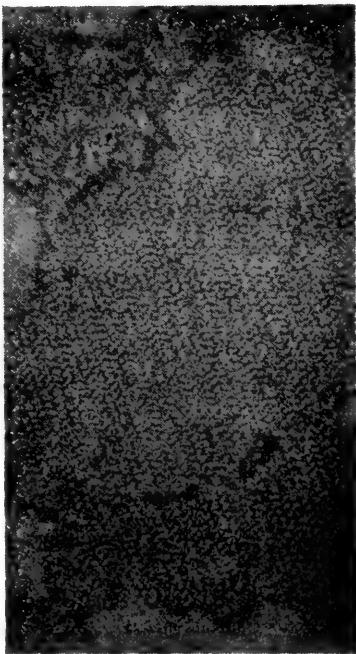


图 14-7 细胞色素 *c* 氧化酶的二维结晶点阵的电镜照片 [蒙 Dr. Steven Fuller and Dr. Roderick Capaldi 特许。]

$$\Delta G^{\circ'} = -52.6 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^{\circ'} = +7.3 \text{ kcal/mol}$$

其次，线粒体内膜必须是不能让质子通过的，因为必须有一封闭的区域才能存在质子梯度。

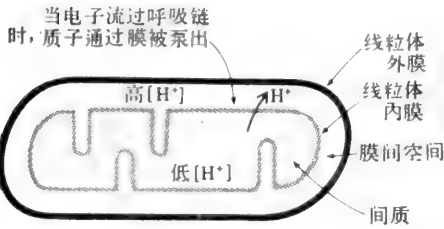


图14-8 电子通过呼吸链的传递产生了跨越线粒体内膜的质子梯度和膜电势。

所提出的这一机理的实质是：贮藏能量的主要动作是质子跨越线粒体内膜的运动。

米切尔的假说，即氧化作用和磷酸化作用是通过质子梯度而偶联起来的假说，现在已得到许多证据的支持：

1. 在电子传递过程中产生了跨越线粒体内膜的质子梯度。外面的pH比里面的低1.4个单位，膜电势为0.14V，外面是正的。总的电化势 $\Delta p$ （以伏为单位）是由膜电势（ $\Delta \psi$ ）

和 $H^+$ 浓度梯度（ $\Delta pH$ ）所组成的。在下列方程式中， $R$ 为气体常数， $T$ 为绝对温度， $F$ 为法拉第的卡当量。

$$\Delta p = \Delta \psi - \frac{RT}{F} \Delta pH = \Delta \psi - 0.06 \Delta pH = .14 - .06(-1.4) = .224V$$

这个0.224伏的总的质子移动力相当于每摩尔质子5.2千卡自由能。

2. 当把一pH梯度强加于线粒体或叶绿体（338页）时，在没有电子传递的情况下也有ATP的合成。

3. 盐细菌的一种紫膜蛋白在照光时也泵动质子（344页）——含有这种细菌蛋白的合成的囊泡和从牛心脏线粒体制得的纯化的ATP酶在照光时也合成ATP。在这一实验中，紫膜蛋白代替了呼吸链，这表明呼吸链和ATP酶在生物化学上是分开的体系，它们只是由质子梯度联系起来的。

4. 呼吸链（244页）和ATP酶（245页）在线粒体内膜中都是定向地组织在一起的。

5. 氧化磷酸化需要一密闭的区域。在可溶性的制剂或没有固定的内外区域的膜碎片中，与电子传递偶联的ATP合成都不能发生。

6. 携带质子穿过线粒体内膜的物质使质子梯度散失，因而也使氧化作用与磷酸化作用解联（248页）。

### 在三个部位产生质子梯度

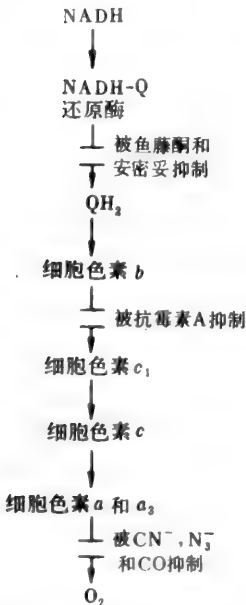


图14-9 某些电子传递抑制剂的作用部位

当电子从NADH经过呼吸链而传递到 $O_2$ 时，在三个部位泵出质子（图14-9）：部位1是NADH-Q还原酶复合物；部位2是 $QH_2$ 细胞色素c还原酶复合物；部位3是细胞色素c氧化酶复合物。在每一部位上来自NADH的一对电子的传递产生的质子梯度用于合成一分子ATP。这些部位是用几种实验方法鉴定出来的：

1. 比较几种物质氧化时ATP的产量 NADH的氧化产生三个ATP，而琥珀酸的氧化产生两个ATP。 $FADH_2$ 的电子在辅酶Q处进入电子传递链，辅酶Q比部位1磷酸化的能量水平低。当人工的底物抗坏血酸被氧化时只形成一个ATP，因为抗坏血酸的电子在细胞色素c处进入，它比部位2磷酸化的能量水平又



低一些。常用  $P:O$  的比值作为氧化磷酸化的指标,  $P:O$  比值的定义是每消耗一原子氧时掺入有机形式中的无机磷酸的摩尔数。NADH, 琥珀酸和抗坏血酸氧化的  $P:O$  值分别为 3, 2 和 1。

2. 热力学的估计 从NADH到能量最低的NADH-Q还原酶中的FeS中心的电子传递  $\Delta G^\circ$  为  $-12\text{kcal/mol}$ ; 从细胞色素  $b$  到  $QH_2$ -细胞色素  $c$  还原酶的  $c_1$  的为  $-10\text{kcal/mol}$ ; 在细胞色素  $c$  氧化酶中从细胞色素  $a$  到  $O_2$  的为  $-24\text{kcal/mol}$ 。这些氧化还原反应放能足够多, 可以在标准状况下推动ATP的合成 ( $\Delta G^\circ = -7.3\text{kcal/mol}$ )。其它电子传递反应, 即由辅酶Q和细胞色素  $c$  所负责的, 其  $\Delta G^\circ$  值太小, 不足以支持ATP的合成。

3. 电子传递的专一性抑制 鱼藤酮和安密妥专一地抑制NADH-Q还原酶复合物中的电子传递, 因而阻止部位1 (见图14-9) 的质子梯度的产生。反之, 这些抑制剂不干扰琥珀酸的氧化, 因为这种底物的电子是在此抑制部位之外在辅酶Q处进入电子传递链。抗霉素A抑制细胞色素  $b$  和  $c_1$  之间的电子流, 它抑制与部位2的质子梯度的产生相偶联的ATP合成。加入抗坏血酸可以绕过这种抑制, 因为抗坏血酸直接还原细胞色素  $c$ 。于是电子从细胞色素  $c$  流向  $O_2$ , 同时有ATP合成, 它与部位3的质子梯度偶联。最后  $CN^-$ ,  $N_3^-$  和  $CO$  抑制细胞色素氧化酶复合物和  $O_2$  之间的电子流。氰化物和叠氮化物与载体的高铁形式起反应, 而一氧化碳则抑制亚铁形式。在这些抑制剂存在下因为电子流被阻断, 所以和部位3上所产生的质子梯度相偶联的磷酸化不能发生。

这些抑制剂的作用部位是用交换技术 (crossover technique) 揭示出来的。钱斯, B. (Britton Chance)\* 设计了一些卓越的光谱学方法来测定每一种载体的氧化形式与还原形式之比。这是易于作到的, 因为每种载体的氧化态和还原态各有其特征的吸收光谱。加入一种电子传递的抑制剂会改变每一种载体的氧化态与还原态之比。例如, 加入抗霉素A就使NADH和细胞色素  $b$  之间的载体变得更为还原。反之, 细胞色素  $c$  与  $O_2$  之间的载体却变得更为氧化。因此, 可以得出结论说抗霉素A抑制的是细胞色素  $b$  到  $c_1$  间的电子传递, 因为这一步正是交换点 (crossover point)。

4. 合成仅有一个作用部位的囊泡体系 三个泵出质子的部位中每一个都已有磷脂囊泡和ATP酶的重建的合成体系。将一种可被氧化的底物加于这些囊泡会导致质子移动力的产生, 这种移动力足以使每对电子产生一个ATP。

## 质子由取向不对称的横穿膜的复合物泵出

由于电子流经呼吸链中三个贮能部位而产生质子梯度的现象要求它们在膜上的取向是不对称的。其次, 这三个复合物必须横穿膜, 质子才能从间质一侧被泵出到细胞质一侧。用超声波破碎线粒体使形成亚线粒体颗粒 (见图14-10) 曾是研究电子传递链的这些重要方面的非常有用的方法。亚线粒体颗粒的外表面相当于完整线粒体内膜的间质面。这样就可以用实验方法去接近线粒体内膜的两个表面: 完整线粒体中的细胞质表面和亚线粒体颗粒中的间质表面。曾用蛋白水解酶、专一的抗体、外源凝集素、不能穿透的起标记作用的试剂等研究这些制剂中呼吸链的各种组分蛋白的排列。例如, 细胞色素氧化酶的亚基II、V和VI只能从间质一侧使之标记。此外, 细胞色素氧化酶只是在细胞质面上与细胞色素  $c$  结合, 而且只朝一个方向泵出质子。这些实验以及关于NADH-Q还原酶和  $QH_2$ -细胞色素  $c$  还原酶的相应实验

(表14-2) 已证明所有三种贮藏能的部位都是横跨线粒体内膜的, 它们的取向也都是不对称的。

被转运的质子是哪里来的呢? 一个可能是被泵出的质子就是那些直接参加这三个部位所催化的反应的质子。例如, 当NADH把两个电子给予NADH-Q还原酶复合物时, 就牵涉到两个 $H^+$ , 一个来自NADH本身, 一个来自溶剂。另一种可能是, 被转运的质子间接地来自于构象的相互作用, 即酶复合物不同区域内催化部位和质子结合部位的相互作用。电子传递反应的化学计算指出, 通过直接机理每个电子只能泵出一个质子, 或每个贮能部位泵出两个质子。然而已观察到 $H^+$ /部位之值为3到4, 这与直接机理是不一致的。看来很可能的是通过每一贮能部位的电子传递产生一种可以传递的构象变化, 而这种构象变化把质子从膜的间质侧抛到细胞质侧去。回忆一下, 血红蛋白的波尔效应中质子就是来自于远离血红素基的分子中不同部位的(60页)。

表 14-2 线粒体的电子传递链的组分

酶 复 合 物	质量(kdal)	辅 基	接 合 部 位 位 置		
			M-侧	中 部	C-侧
NADH-Q还原酶	850	FMN FeS	NADH	Q	
琥珀酸-Q还原酶	97	FAD FeS	琥珀酸	Q	
QH <sub>2</sub> -细胞色素c	280	血红素b 血红素c <sub>1</sub> FeS		Q	Cytc
细胞色素c	13	血红素c			Cytc <sub>1</sub> Cyt a
细胞色素c氧化酶	200	血红素a 血红素a <sub>3</sub> Cu	O <sub>2</sub>		Cytc

来源: J.W.DePierre and L. Ernster, *Ann.Rev. Biochem.* 46 (1977): 215.

注: 除细胞色素c和辅酶Q外, 所有的组分都是膜本体蛋白, 细胞色素c是水溶性的膜周围蛋白质, 辅酶Q是脂溶性的醌。M-侧、中部和C-侧分别表示线粒体内膜的间质侧、碳氢核心和细胞溶质侧。

质子经过一质子通道流回间质即有ATP合成

现在我们来讨论利用质子梯度合成ATP。在亚线粒体颗粒的电镜照片上看到催化这一过程的酶是表面上球形的突起物(图14-10)。在完整线粒体中, 这些突起是在线粒体内膜的间质一侧。1960年, 拉克尔(Efraim Racker)发现这些小突起物(直径85Å)可以用机械振动的方法除去。条状的亚线粒体颗粒能通过其电子传递链传递电子, 但不再能进行ATP的合成。反之, 分离的85Å的小球则催化ATP的水解。最令人感兴趣的是, 拉克尔发现将这些ATP酶的小球加到条状的亚线粒体颗粒中就能恢复它们合成ATP的能力。这些小球就称为偶联因子1或F<sub>1</sub>。F<sub>1</sub>单位的生理作用是催化ATP的合成。溶解的F<sub>1</sub>(在没有质子梯度情况下)所表现的ATP酶活力就是其生理反应的逆转。

F<sub>1</sub>单位的质量为360kda1, 含有五种多肽链(表14-3), 它只是线粒体中合成ATP的机器的一部分。这一复合物的另一主要单位是F<sub>0</sub>, 四条多肽链的一种疏水的片断, 它嵌在线粒体

内膜中。 $F_0$ 是这种复合物的质子通道。 $F_0$ 和 $F_1$ 之间的柄包括几种其它的蛋白质（表14-3）。

表 14-3 线粒体中合成ATP的复合物的组分

亚 基	质量 (kda)	作 用	所在部位
$F_1$	360	含有ATP合成的催化部位	间质侧的球状头部
$\alpha$	53		
$\beta$	50		
$\gamma$	33		
$\delta$	17		
$\epsilon$	7		
$F_0$	29 22 12 8	含有质子通道	横跨膜
$F_1$ 抑制物	10	调节质子流和ATP合成	$F_0$ 和 $F_1$ 间的柄
产生对寡霉素有敏感性的蛋白质 (OSCP)	18		
$F_1F_0$ ( $F_0$ )	8		

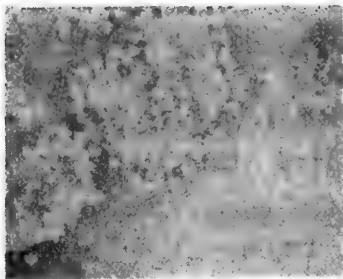
来源: J.W.DePierre and L. Ernster, *Ann. Rev. Biochem.* 46(1977): 216.

其中一种蛋白质使此复合物对寡霉素敏感，寡霉素是一种抗菌素，它干扰质子梯度的利用，从而抑制ATP的合成。

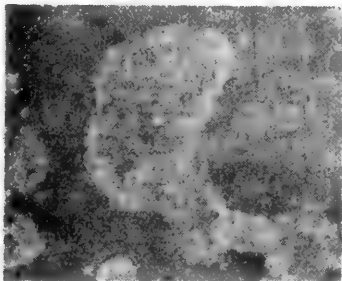
质子通过 $F_0$ 通道从膜的细胞质侧流到间质侧的结果，就是 $F_1$ 合成ATP。质子流是怎样与ATP的合成偶联的呢？也像关于质子的泵出问题一样，曾提出过直接的机理和间接的机理。一种假设是质子流直接作用于ATP的合成部位。在这种图式中， $P_i$ 被活化并同时受到ADP的攻击，于是产生ATP。另一种假设是，质子流与ATP合成的偶联可能是通过酶复合物传递过来的构象变化而实现的。

来自细胞质中NADH的电子通过甘油磷酸穿梭而进入线粒体

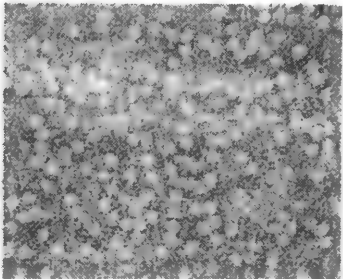
完整的线粒体是不能让NADH和 $NAD^+$ 透



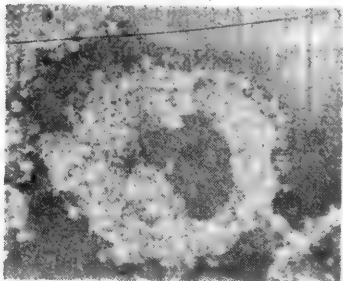
A



B



C



D

图14-10 各种电镜照片：(A)亚线粒体颗粒， $F_1$ 伸出其表面之上；(B)尿素处理过的亚线粒体颗粒，此种处理去掉了突出的 $F_1$ ；(C)分离的 $F_1$ 单位；(D)将 $F_1$ (偶联因子)加到膜的细条上所形成的重组的亚线粒体颗粒。B部分所示的颗粒能将电子传递给 $O_2$ ，但不能形成ATP。D部分所示的重组的颗粒能进行氧化磷酸化作用。[蒙Dr. Efraim Backer特许。]

过的。那么细胞质中的NADH是怎样被呼吸链氧化的呢？糖酵解中甘油醛3-磷酸的氧化产生NADH。为了糖酵解的继续，NAD<sup>+</sup>必须再生出来。答案是来自NADH的电子，而不是NADH本身，被带过线粒体膜。一种载体就是甘油3-磷酸，它极易透过线粒体外膜。这一穿梭的第一步（图14-11）是电子从NADH传递到二羟丙酮磷酸，形成甘油3-磷酸。这一反应

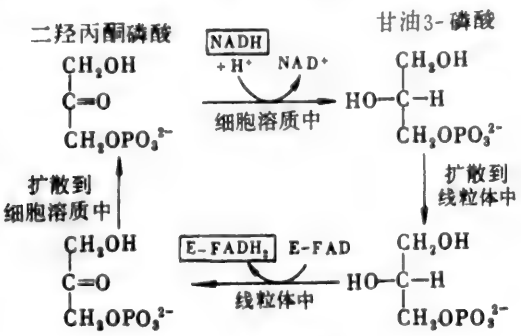
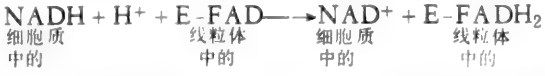


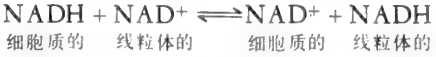
图14-11 甘油磷酸穿梭。

由甘油3-磷酸脱氢酶催化，发生在细胞溶质中。然后甘油3-磷酸进入线粒体，并由一种脱氢酶的FAD辅基重新氧化为二羟丙酮磷酸，这种脱氢酶结合在线粒体内膜上。这种线粒体中与FAD相连的甘油脱氢酶与细胞溶质中的与NAD<sup>+</sup>相连的甘油脱氢酶不同。然后由甘油3-磷酸的氧化而形成的二羟丙酮磷酸又从线粒体中扩散出来，到达细胞溶质，于是穿梭完成。净反应是



线粒体中还原型的黄素将其电子在辅酶Q的水平上传递给呼吸链。当然，当细胞质中的NADH被甘油磷酸穿梭转运并被呼吸链氧化时，形成的是两个而不是三个ATP。乍看起来，这种穿梭的每一循环好像浪费了一个ATP。这种低产量的由来是因为线粒体中甘油3-磷酸脱氢酶的电子受体是FAD而不是NAD<sup>+</sup>。FAD的利用使得来自细胞质的NADH的电子能够逆着NADH浓度梯度而运至线粒体中。这种转运的代价是每两个电子一个ATP。这种甘油磷酸穿梭在昆虫的飞翔肌肉中特别显著。

在肝脏和心脏中，来自细胞质的NADH的电子是由苹果酸-天冬氨酸穿梭带到线粒体中去的，这种穿梭是以两种膜载体和四种酶为媒介的。电子从细胞溶质的NADH传至苹果酸，苹果酸穿过线粒体内膜，再在线粒体间质中重新被氧化，形成NADH。草酰乙酸不易穿过线粒体内膜，因此需要一个转氨作用以形成天冬氨酸，它能穿过这一障碍。苹果酸-天冬氨酸穿梭的净反应是：



这种穿梭与甘油磷酸穿梭不同，它极易逆转。因此，只有当细胞溶质中NADH/NAD<sup>+</sup>的值比线粒体间质中的高时NADH才能被苹果酸-天冬氨酸穿梭带入线粒体内。苹果酸-天冬氨酸穿梭将电子从NADH传递至线粒体的呼吸链时并不消耗能量，所以每传入一个NADH产生三个ATP。

### ADP进入线粒体需要ATP出来

ATP和ADP都不能透过线粒体内膜而自由扩散。有一种专一的载体使得这两种电荷很多的分子能够越过这一通透性障碍。这种载体的一个有趣的性质是ATP和ADP的流动是偶

联的。只有当ATP出来时，ADP才能进入线粒体间质，反之亦然。这种ATP和ADP的偶联的流动是易化交换扩散（facilitated exchange diffusion）的一个例子。这是以ATP-ADP转运酶（translocase）为媒介的，此转运酶是两个相同的29kdal亚基的二聚体。这种转运酶在内膜中很多，约占其全部蛋白质的6%。膜的细胞质一侧的ADP的运输优先于ATP，这可能部分地说明 $[ATP]/[ADP][P_i]$ 在细胞质一侧比在间质一侧所以高出十倍的原因。转运酶所引起的ATP和ADP的偶联的转运可能是由跨过线粒体内膜的质子梯度所推动的。ATP-ADP转运酶专一地极为低浓度的苍朮苷（一种植物糖苷）或米酵霉酸（bongkrelic acid，一种霉菌所产生的抗菌素）所抑制。加入这些抑制剂之后，由于线粒体内ADP的供应不能得到补充，氧化磷酸化很快就停止。

线粒体含有许多转运离子和代谢物的体系

ATP-ADP转运酶仅仅是线粒体的许多转运体系中的一种。线粒体内膜中有许多种离子和带电荷的代谢物的载体。例如，二羧酸载体是苹果酸、琥珀酸、延胡索酸和 $P_i$ 的促进交换扩散的媒介。三羧酸载体转运柠檬酸。细胞溶质中的丙酮酸通过丙酮酸载体与 $OH^-$ 交换进入线粒体间质。谷氨酸和天冬氨酸通过谷氨酸载体相互交换，这种载体也转运 $OH^-$ 。线粒体还含有一种钙离子的转运系统。线粒体间质中 $Ca^{2+}$ 所积累的自由能的直接来源不是ATP，而是由电子传递所产生的质子移动力。

葡萄糖完全氧化产生36个ATP

现在我们可以计算葡萄糖完全氧化时产生多少ATP（表14-4）。总反应是：  
葡萄糖 + 36ADP + 36 $P_i$  + 36 $H^+$  + 6 $O_2$  → 6 $CO_2$  + 36ATP + 42 $H_2O$

表 14-4 葡萄糖完全氧化的ATP产量

反 应 序 列	每一葡萄糖的ATP 产量
糖酵解：葡萄糖变为丙酮酸（细胞溶质中）	
葡萄糖的磷酸化	- 1
果糖6-磷酸的磷酸化	- 1
2分子1,3-DPG的脱磷酸化	+ 2
2分子磷酸烯醇式丙酮酸的脱磷酸化	+ 2
2分子甘油醛3-磷酸的氧化形成2NADH	
丙酮酸转变为乙酰CoA（线粒体中）	
形成2NADH	
柠檬酸循环（线粒体中）	
由2分子琥珀酰辅酶A形成2分子鸟苷三磷酸	+ 2
异柠檬酸、 $\alpha$ 酮戊二酸和苹果酸各2分子氧化共形成6NADH	
2分子琥珀酸的氧化形成2 $FADH_2$	
氧化磷酸化（线粒体中）	
糖酵解中形成2NADH：每1NADH产生2ATP （假定NADH由甘油磷酸穿梭转运）	+ 4
丙酮酸的氧化性脱羧形成2NADH：每1NADH产生3ATP	+ 6
柠檬酸循环中形成2 $FADH_2$ ：每1 $FADH_2$ 产生2ATP	+ 4
柠檬酸循环中形成6NADH：每1NADH产生3ATP	+ 18
每分子葡萄糖净产生	+ 36

因为生成36个ATP，消耗12个氧原子，所以  $P:O$  比值为3。大多数ATP，即36个中的32个，是由氧化磷酸化产生的。

生成ATP的总效率是高的。在标准状况下葡萄糖的氧化产生686kcal:



贮存在36个ATP中的自由能为263kcal，因为ATP水解的  $\Delta G^{\circ'}$  为  $-7.3 \text{kcal}$ 。因此，在标准状况下，由葡萄糖产生ATP的热力学效率是  $263/686$ ，或38%。

呼吸商 (RQ) 是整体生物代谢研究中常用的指标，其定义为

$$RQ = \frac{\text{所产生的 } \text{CO}_2 \text{ 的摩尔数}}{\text{所消耗的 } \text{O}_2 \text{ 的摩尔数}}$$

碳水化合物完全氧化的 RQ 为1.0，脂肪和蛋白质的 RQ 分别为0.71和0.80左右。因此，RQ 可用作生物体对碳水化合物、脂肪和蛋白质相对利用量的指标。

## 氧化磷酸化的速率决定于对ATP的需要

在大多数生理条件下，电子传递与磷酸化是紧密偶联的。电子通常不能经过电子传递链

传递到  $\text{O}_2$ ，除非ADP同时被磷酸化为ATP。氧化磷酸化要求有NADH（或其它来源的高电势电子）， $\text{O}_2$ 、ADP和 $\text{P}_i$ 的供应。决定着氧化磷酸化速率的最重要的因素是ADP的水平。当加入ADP时组织匀浆的耗氧速率显著增加，随后当所加入的ADP已转变为ATP时，耗氧速率又降回到起始时的数值(图14-12)。

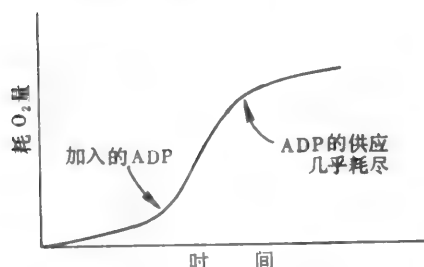


图14-12 呼吸控制 只有当ADP磷酸化为ATP时电子才传递到 $\text{O}_2$

ADP水平对氧化磷酸化速率的调节称为呼吸控制。

这种调节机理的生理意义是显而易见的。当ATP被消耗时ADP水平升高，因而氧化磷酸化就与ATP的利用偶联起来了。除非需要合成ATP，否则电子不

会从燃料分子流到 $\text{O}_2$ 。

## 二硝基苯酚使质子梯度消失从而使氧化磷酸化解联

电子传递与磷酸化的紧密偶联可被2,4-二硝基苯酚 (DNP) 和其它酸性的芳香族化合物 (图14-13) 破坏。这些物质携带质子穿过线粒体内膜。在这些解联剂的存在下，电子从NADH到 $\text{O}_2$ 的传递正常进行，但线粒体的ATP酶不能形成ATP，因为跨越线粒体内膜的质子移动力消失了。呼吸控制的丧失导致耗氧量和NADH的氧化增强。相反，DNP对底物水平的磷酸化没有影响。由于DNP和其它解联剂对呼吸链的专一性作用，它们在代谢的研究中是很有用的。

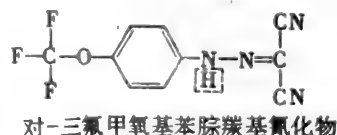


图14-13 两种氧化磷酸化解联剂的结构式 这些脂溶性物质能携带质子穿过线粒体内膜 线框内为可离解的质子。

氧化磷酸化的解联可能在生物学上有用。在冬眠中的动物、某些新生下来的动物和适应于寒冷的动物体内，它是一种产生热以维持体温的方法。含有大量线粒体的棕色脂肪组织是适于进行这种生热过程的特化组织。脂肪酸是棕色脂肪组织中的解联剂。而去甲肾上腺素则控制脂肪酸的释放。因此，棕色脂肪组织中氧化磷酸化解联的程度是受着激素控制的。这种组织中的线粒体既可能是ATP的发生器，又可能是一个微型火炉。

曾有过一篇有趣的报告说一个三十八岁的妇女不能进行长时间的体力劳动。她的基础代谢率为正常的二倍以上，但她的甲状腺功能是正常的。活肌肉组织的检查表明她的线粒体在结构上变化很大而且不正常。后来生物化学的研究证明这些线粒体中没有呼吸控制。不管ADP是否存在，NADH总是被氧化。换言之，在这些线粒体中氧化作用和磷酸化作用并不是密切偶联着的。而且，它们的P:O值低于正常值。因此，在这一病人体内，燃料分子的很多能量是转化为热而不是转化为ATP。这种线粒体中分子上的缺陷是什么，尚未被阐明。

### 细胞色素c 的三维结构

细胞色素c 是唯一的能够用温和处理的方法使之从线粒体内膜分离得到的传递电子的蛋白质。这种膜周围蛋白的水溶性十分有利于其提纯和结晶。关于细胞色素c 的结构确实比任何其它作为电子载体的蛋白质的结构知道得多得多。

细胞色素c 是由一条104个氨基酸残基的多肽链和一个共价结合的血红素基团组成的。亚铁型和高铁型的细胞色素c 的三维结构已经在差不多原子分辨率的水平上由迪克森，R. (Richard Dickerson) 阐明了 (图14-14)。这种蛋白质大致上是球形的，直径34Å。血红素基团被许多紧密排在一起的疏水侧链所包围。

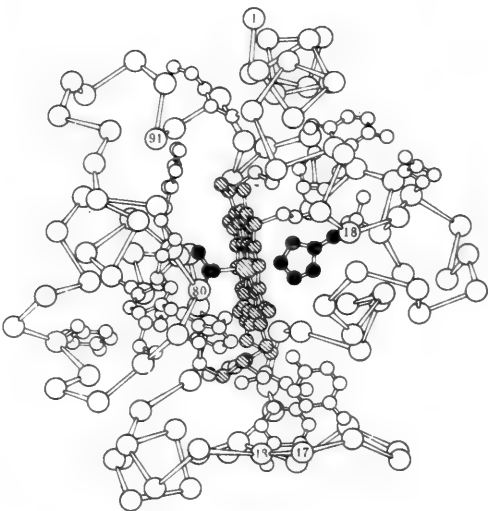


图14-14 金枪鱼的还原型细胞色素c 的三维结构。图中示出血红素基 (中间一串影线球)、甲硫氨酸-80 (左侧黑球)、组氨酸-18 (右侧黑球) 和  $\alpha$ -碳原子。[引自T. Takano, O. B. Kallai, R. Swanson, and R. E. Dickerson, *J. Biol. Chem.* 248 (1973): 5244.]

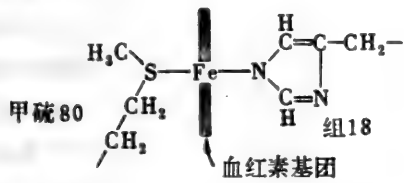


图14-15 细胞色素c 的血红素基团中的铁原子与一甲硫氨酸侧链和一组氨酸侧链形成键。

铁原子与甲硫氨酸的硫原子和组氨酸残基的氮原子形成键 (图14-15)。血红素环境的疏水性使得细胞色素c 的氧还电势比水介质中的同样的血红素复合物的要正一些 (相当于电子亲和力强一些)。从细胞色素c 的血红素中移走一个电子要比从水中的血红素中移走一个电子在力学上较为经济，因为细胞色素c 中靠近铁原子的介电常数较小。



可以把分子的整个结构特点看作是有一个外壳（一个残基厚）包围着血红素。疏水侧链组成了这个壳的最里层；然后是主链，表面上是带电荷的侧链（很少 $\alpha$ 螺旋，也没有 $\beta$ 折叠片。实质上，多肽链是绕在血红素外面的）残基1到47在血红素的组氨酸18一侧（称为右侧），而残基48到91在甲硫氨酸80一侧（称为左侧）残基92到104又从血红素的后面绕回到右侧。

## 细胞色素c 与其还原酶和氧化酶的相互作用

如前所述，细胞色素c将电子从QH<sub>2</sub>细胞色素c还原酶复合物（第二个保存能量的部位）传递至细胞色素c氧化酶复合物（第三个保存能量的部位）细胞色素c怎样与它的还原酶相互作用，以后又怎样与它的氧化酶相互作用呢？关键在于蛋白质表面上带电荷的残基的分布。到目前为止已经研究过的所有各种生物的细胞色素c分子都有一簇赖氨酸侧链在蛋白质的一个面（图14-14的前面）上围绕着血红素的缝隙。细胞色素c表面上的电荷分布在识别和结合还原酶和氧化酶方面几乎肯定是起作用的。例如，假若赖氨酸13被修饰，那么细胞色素c与细胞色素氧化酶的相互作用就削弱了。其次，多聚赖氨酸与细胞色素c竞相争夺和氧化酶及还原酶相结合。

细胞色素c怎样从它的还原酶接受电子，而后又怎样把这电子给予其氧化酶呢？根据推理，可能有两种机理。电子可以通过芳香族侧链的转送而在不同蛋白质的血红素基团之间传递。另一可能是，电子直接从一个血红素传到另一个血红素。重要的是应注意到，血红素所携带的电子并不限于在铁原子中。它是部分地非定域化的，属于血红素的整个共轭 $\pi$ 电子网。因此，假若两个血红素的边缘足够近（距离小于8 Å），而且假若它们的平面几乎是平行的，电子就有可能从一个血红素传递到另一个血红素。电子传递的直接机理似乎可能性更大，因为形成芳香族侧链的自由基阴离子所需要的自由能很多。其次，细胞色素c的血红素基团的一个边（图14-14中前面的边）是直接的电子传递反应能达到的。

## 细胞色素c 的构象十亿年来基本未变

细胞色素c存在于全部具有线粒体呼吸链的生物体内：植物、动物和真核的微生物。这种电子载体是在十五亿年以前，尚未分化出植物和动物时出现的。在这一时期之内，这种蛋白质的功能一直保持不变，其证据是到目前为止已经试验过的任何一种真核生物的细胞色素c都能和另外任何一种真核生物的细胞色素氧化酶在体外起反应。例如，小麦的细胞色素c就与人的细胞色素氧化酶起反应。这种功能保守性的第二个指标是已研究过的所有细胞色素c的分子，其氧化电势都近于+0.25伏。第三，许多种生物的细胞色素c分子的吸收光谱实际上是无法区分开的。事实上，某些原核生物的细胞色素，例如一种光合细菌的细胞色素c<sub>2</sub>和一种反硝化细菌的细胞色素c<sub>550</sub>，和金枪鱼心脏线粒体的细胞色素c极为相似（图14-16）。

史密斯，E. (Emil Smith)、马戈里雅什，E. (Emanuel Margoliash) 和其他人曾测定过80种范围广泛的真核生物的细胞色素c的氨基酸顺序。惊人的发现是在十五亿年以上的进化过程中104个残基中的26个毫无变化。现在已经知道了这种分子的三维结构，所以其中许多残基维持不变的理由就清楚了。如所预料，血红素的配位体甲硫氨酸80和组氨酸18都是不变的，与血红素共价结合的两个半胱氨酸也不变。在所有的细胞色素c分子中从70到80这11个残基的



顺序几乎是相同的。与血红素接触的许多疏水性残基也是不变的。还有,细胞色素c中的大多数甘氨酸残基也保留着。如前所述(146页),甘氨酸是重要的,因为它小。多肽链的紧实折叠需要在某些部位上有甘氨酸存在。几个不变的赖氨酸和精氨酸残基位于分子表面上带正电荷的一簇簇残基中。这些簇中有一个与细胞色素c还原酶相互作用,另一个与细胞色素氧化酶相互作用。

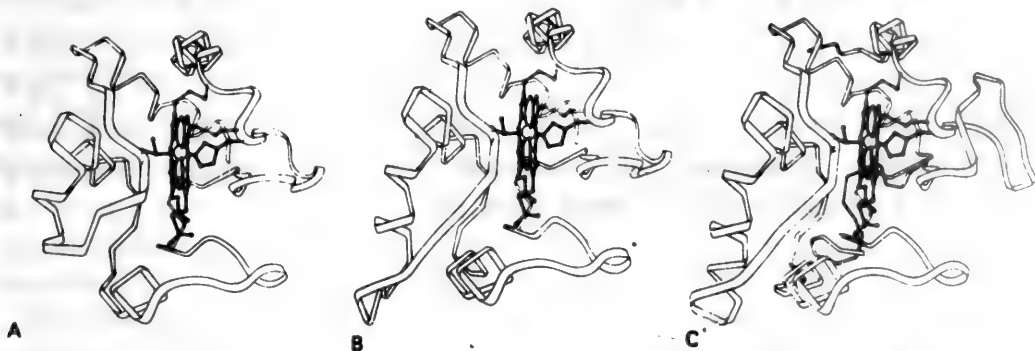


图14-16 细胞色素c的三维结构在进化过程中的保守性,下列构象的相似性可以说明:(A)金枪鱼心脏线粒体的细胞色素c,(B)光合细菌(*Rhodospirillum rubrum*)的细胞色素c<sub>2</sub>,(C)反硝化细菌(*Paracoccus denitrificans*)的细胞色素c<sub>550</sub>。[蒙F.R.Salamme 特许转载,引自 the Annual Review of Biochemistry, Volume 46, © 1977 by Annual Reviews Inc.]

由质子梯度进行动力的传送:生物力能学  
中的一个中心课题

本章所讲的主要概念是线粒体中的电子传递和ATP的合成是由一种跨膜的质子梯度联系起来的。细菌和叶绿体(338页)中的ATP合成也是由质子梯度推动的。事实上,质子梯度是各种各样需能过程的动力,这些过程有:线粒体对Ca<sup>2+</sup>的主动转运,某些氨基酸和糖进入细菌,细菌鞭毛的旋转,电子从NADH传递到NADPH。质子梯度也可用于产生热,如在动物冬眠时那样。显然,质子梯度是生物体系中占有中心位置的可以相互转换的自由能通货(图14-17)。

为什么在进化过程中选择质子梯度来起这种作用呢?米切尔(Mitchell,1976)提出了下列理由:

由质子梯度进行能量转导是十分简单和高效率的,因为全部

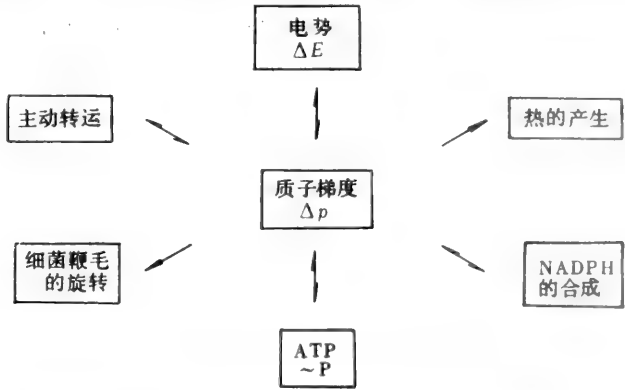


图14-17 质子梯度是自由能的一种可以相互转变的形式

所需要的东西不过是两个水的质子-导体相之间的一层薄的拓扑学上密闭的和绝缘的液态膜。插在膜的任何一点上的质子梯度发生器都可以起质子动力源的作用,这种动力可以被插在膜上任何地方的另一点上的适当的耗能单元所利用,即使从分子的大小来看生产单元和消耗单元距离很远。生物学中动力转导的这种化学渗透类型的体系是电生理学家所熟悉的,他们研究动物的质膜,动力是通过 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 离子活度的梯度而跨过质膜进行转导的,例如在神经传导中和小肠对养分的吸收中都是这样。但是,因为质子的高度反应活性和移动性,使得它能在很低的浓度下起作用,所以生物学中利用质子梯度进行动力转导就因其存在的普遍性和应用范围的广泛性而有独到之处。…记住以下一点是很有教益的:现代技术的进步导致微型电子设备发展的亿万年之前,这些微型的质子设备就已在偶然中被发明并由自然选择发展到了惊人的精巧程度。自然界的质子设备的详细机理的阐明可能不仅为探求知识的生物化学家,也为寻求新发明的技术专家提供智慧的营养和灵感。

## 概 要

在氧化磷酸化作用中,ATP的合成是与电子从NADH或 $\text{FADH}_2$ 流向 $\text{O}_2$ 相偶联的,这种偶联又是通过跨越线粒体内膜的质子梯度而实现的。电子流经三个取向不对称的跨越膜的复合物,其结果是由线粒体间质中将质子泵出并产生膜电位。当质子经由一个通道流回间质时,就合成了ATP,这一通道就在称为线粒体ATP酶的合成ATP的复合物中。氧化磷酸化代表着生物力能学的一个基本课题:由质子梯度进行自由能的传导。

线粒体内膜的呼吸酶集合体中的电子载体有:黄素、铁硫复合物、醌类和细胞色素的血红素基团。来自NADH的电子传递至三个复合物中的第一个,即NADH-Q还原酶的FMN辅基。这种还原酶也含有FeS中心。电子进入 $\text{QH}_2$ ,即泛醌(Q)的还原型。这种流动性很大的载体又把它的电子传递给 $\text{QH}_2$ -细胞色素c还原酶,一种含有细胞色素b和 $c_1$ 以及铁硫中心的复合物。这第二个复合物还原细胞色素c,一种水溶性的膜周围蛋白质。细胞色素c也像Q一样,是一种流动性的电子载体,然后电子传递给细胞色素c氧化酶。这第三种复合物含有细胞色素a和 $a_3$ 。这种氧化酶中的亚铜离子将电子传递给最终的受体 $\text{O}_2$ ,形成 $\text{H}_2\text{O}$ 。

两个电子流经这三种复合物中每一个时都产生质子梯度,足以合成一分子ATP。因此,每一NADH被氧化就产生三个ATP,而每一 $\text{FADH}_2$ 被氧化只产生两个ATP,因为它的电子是在 $\text{QH}_2$ 处进入呼吸链, $\text{QH}_2$ 在第一个泵出质子的部位之后。还有,细胞溶质中所形成的NADH的氧化也只产生两个ATP,因为当甘油磷酸穿梭把这些电子带入线粒体时丢失了一个ATP。ADP进入线粒体是与ATP的外出相偶联的,这种偶联是通过一种称为易化交换扩散过程而实现的。当一分子葡萄糖完全氧化为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 时,共产生36个ATP。电子传递通常是与磷酸化作用密切偶联的。只有当ADP同时被磷酸化为ATP时,NADH和 $\text{FADH}_2$ 才被氧化。这种偶联称为呼吸控制,它能被例如DNP这样的解联剂所破坏,DNP带着质子穿过线粒体内膜从而使质子梯度消散。

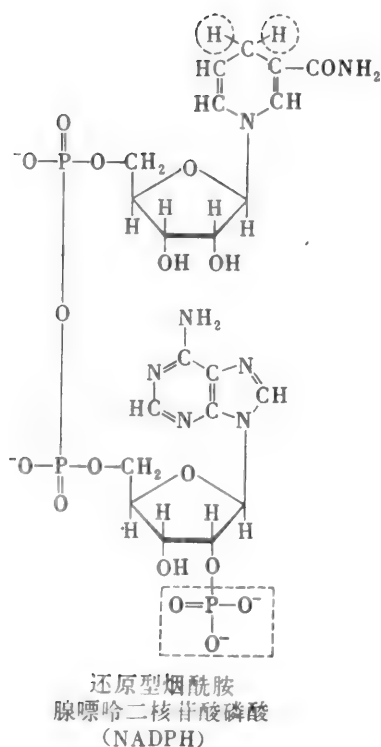
## 习 题

当下列各底物被细胞匀浆完全氧化时,ATP的产量是多少?假定糖酵解、柠檬酸循环和氧化磷酸化

都是充分活跃的。

- (a) 丙酮酸 (b) NADH  
(c) 果糖 1,6-二磷酸 (d) 磷酸烯醇式丙酮酸  
(e) 葡萄糖 (f) 二羟丙酮磷酸
2. (a) 写出还原型谷胱甘肽(263页)被 $O_2$ 完全氧化的方程式来。利用表14-1的数据计算此反应的 $\Delta E_0'$ 和 $\Delta G^{\circ'}$ 。  
(b) 氧化型谷胱甘肽被NADPH还原的 $\Delta E_0'$ 和 $\Delta G^{\circ'}$ 是多少?
3. 下列各抑制剂对呼吸链中的电子传递和ATP的形成各有何影响?  
(a) 叠氮化物 (b) 苍术苷  
(c) 鱼藤酮 (d) DNP  
(e) 一氧化碳 (f) 抗霉素A
4. 向线粒体中加入寡霉素显著降低电子从NADH传递到 $O_2$ 的速率和ATP形成的速率。随后加入DNP则电子传递速率增高而ATP形成的速率无变化。寡霉素抑制什么?
5. 比较琥珀酸被 $NAD^+$ 氧化和被FAD氧化的 $\Delta G^{\circ'}$ 。利用表14-1中的数据,并假定FAD/FADH<sub>2</sub>氧化还原电对的 $E_0'$ 近于0V。为什么在琥珀酸脱氢酶所催化的反应中电子受体是FAD而不是 $NAD^+$ ?
6. 立即注入亚硝酸盐是对氰化物中毒的极有效的处理。这种解毒剂作用的基础是什么? [提示:亚硝酸盐将亚铁血红蛋白氧化为高铁血红蛋白。]
7. 对于0.2V的质子电动势(间质为负),与ATP的合成协调的 $[ATP]/[ADP][P_i]$ 的最大的比值是多少?在计算这一比值时,假定每形成一ATP所转运的质子数为2、3和4个,并且温度为25℃。

## 第15章 戊糖磷酸途径和葡糖异生作用



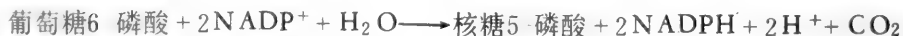
前几章是糖酵解、柠檬酸循环和氧化磷酸化，主要是关于从作为燃料的葡萄糖开始的ATP的产生。我们现在来讨论另一种代谢能——还原能力——的产生。燃料分子中的电子和氢原子必须有一部分保留下来供生物合成之用而不能传递给 $O_2$ 以产生ATP。细胞中易于利用的还原能力的通货是**NADPH**。NADPH的一个核糖单位的C-2上的磷酸基使它有别于NADH。如前已指出的（188页），在大多数生化反应中，**NADPH**和**NADH**之间有着根本的区别。**NADH**被呼吸链氧化以产生ATP，而**NADPH**则在还原性的生物合成中用作氢和电子的供体。本章也讨论非碳水化合物的前体合成葡萄糖的过程，此过程称为葡糖异生作用。

### 戊糖磷酸途径产生NADPH

#### 并合成五碳的糖类

在戊糖磷酸途径中，葡萄糖6-磷酸氧化为核糖5-磷酸时，产生NADPH。这种五碳糖及其衍生物是这样一些重要的生物分子的组分：ATP，CoA， $NAD^+$ ，FAD，

RNA和DNA。



戊糖磷酸途径也通过一系列非氧化性的反应催化三、四、五、六和七碳糖的相互转变。所有这些反应均发生于细胞溶质中。在植物体内，戊糖磷酸途径的一部分也参与光合作用中由 $CO_2$ 形成六碳糖的过程（第19章）。

戊糖磷酸途径有时称为戊糖支路、己糖一磷酸途径或磷酸葡萄糖酸氧化途径。1931年瓦勃格，O. (Otto Warburg) 对此途径中的第一个酶即葡萄糖6-磷酸脱氢酶的发现导致了后人对它的完全阐明，这些人有：李普曼，F. (Fritz Lipmann)，狄更斯，F. (Frank Dickens)，霍雷克，B. (Bernard Horecker) 和拉克尔，E. (Efraim Racker)。

### 葡萄糖6-磷酸转变为核酮糖5-磷酸时产生2NADPH

戊糖磷酸途径始于葡萄糖6-磷酸在C 1上的脱氢，这是由葡萄糖6-磷酸脱氢酶催化的反应（图15-1）。此酶对 $NADP^+$ 高度专一；对 $NAD^+$ 的 $K_M$ 约为对 $NADP^+$ 的 $K_M$ 的1000倍。

产物为6-磷酸葡萄糖酸- $\delta$ -内酯，它是C-1的羧基与C-5的羟基所形成的分子内的酯。下一步是由专一的内酯酶将6-磷酸葡萄糖酸- $\delta$ -内酯水解，产生6-磷酸葡萄糖酸。然后这一六碳糖由6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化，发生氧化性脱羧，产生核酮糖5-磷酸，NADP<sup>+</sup>又是电子受体。

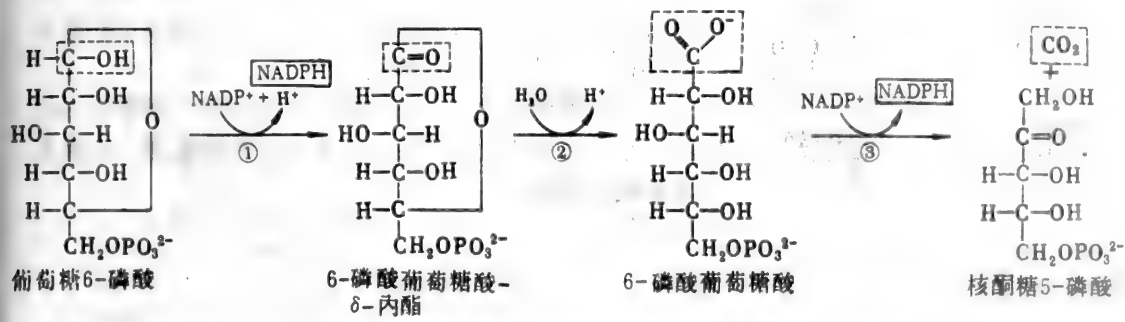
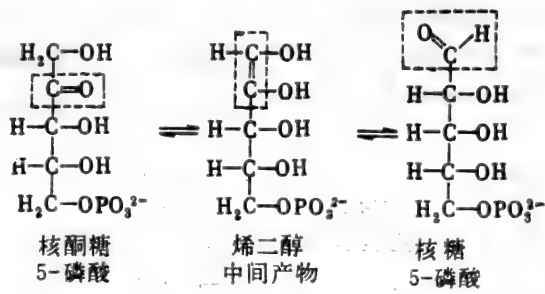


图15-1 戊糖磷酸途径的氧化性分支。这三个反应是由葡萄糖6-磷酸脱氢酶、内酯酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶所催化的。

核酮糖5-磷酸通过烯二醇中间产物异构化为核糖5-磷酸

合成核糖5-磷酸的最后一步是由磷酸戊糖异构酶催化的核酮糖5-磷酸的异构化。

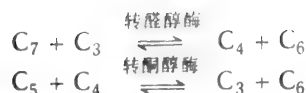


这一反应与糖酵解中葡萄糖6-磷酸=果糖6-磷酸以及二羟丙酮磷酸=甘油醛3-磷酸的反应类似。这三种酮糖-醛糖异构化作用都是通过一个烯二醇中间产物进行的。

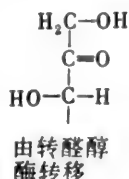
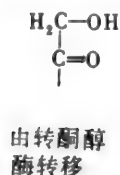
### 戊糖磷酸途径和糖酵解由转酮醇酶和转醛醇酶联系起来

上述各反应中，每一葡萄糖6-磷酸被氧化就产生两个NADPH和一个核糖5-磷酸。可是，许多细胞所需要的NADPH比核糖5-磷酸多得多，NADPH是用于还原性的生物合成的，核糖5-磷酸是用于掺入核苷酸和核酸的。在这些情况下，核糖5-磷酸是由转酮醇酶和转醛醇酶转变为甘油醛3-磷酸和果糖6-磷酸。这两种酶通过催化以下三个反应而创造了一种戊糖磷酸途径与糖酵解之间的可逆的纽带：



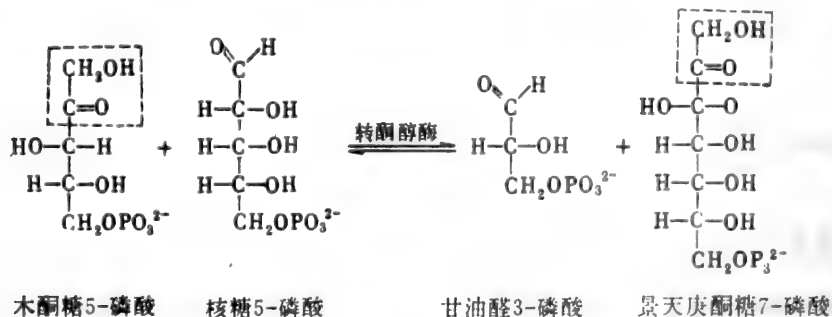


这些反应的总和是由三个戊糖形成两个己糖和一个丙糖。

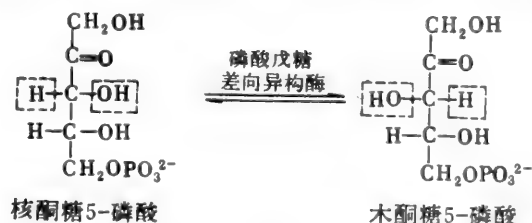


这些反应的实质是转酮醇酶转移一个两碳单位，而转醛醇酶转移一个三碳单位。供给二或三碳单位的糖总是酮糖，而其受体总是醛糖。

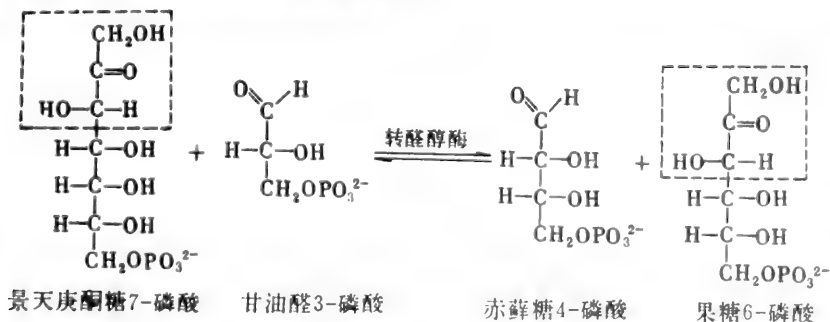
把戊糖磷酸途径与糖酵解联系起来的三个反应中的第一个是由两个戊糖形成一个甘油醛3-磷酸和一个景天庚酮糖7-磷酸。



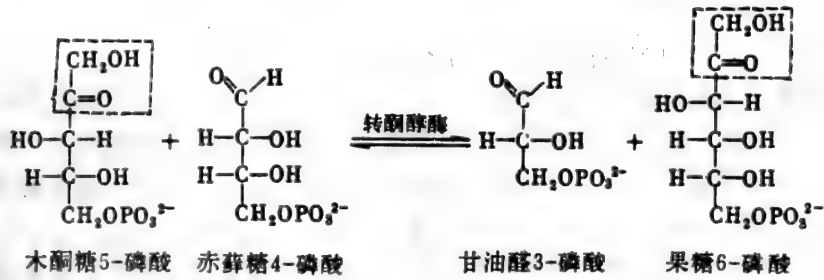
这一反应中两碳单位的供体是木酮糖5-磷酸，它是核酮糖5-磷酸的差向异构体。只有当一个酮糖C-3上的羟基具有木酮糖的构型而不是核酮糖的构型时，它才能是转酮醇酶的底物。核酮糖5-磷酸要由磷酸戊糖差向异构酶所催化的转酮醇酶反应转变为适当的差向异构体。



然后甘油醛3-磷酸和景天庚酮糖7-磷酸发生反应，形成果糖6-磷酸和赤藓糖4-磷酸。这一四碳糖和六碳糖的合成是由转醛醇酶催化的。



在第三个反应中，转酮醇酶催化赤藓糖4-磷酸和木酮糖5-磷酸合成为果糖6-磷酸和甘油醛3-磷酸的反应。



这些反应的总和是：

2 木酮糖5-磷酸 + 核糖5-磷酸  $\rightleftharpoons$  2 果糖6-磷酸 + 甘油醛3-磷酸

核糖5-磷酸可先后通过磷酸戊糖异构酶和磷酸戊糖差向异构酶而形成木酮糖5-磷酸，所以由核糖5-磷酸开始的净反应是：

3 核糖5-磷酸  $\rightleftharpoons$  2 果糖6-磷酸 + 甘油醛3-磷酸

这样，由戊糖磷酸途径所形成的多余的核糖5-磷酸可以定量地转变为糖酵解的中间产物。

表15-1 戊糖磷酸途径

反 应	酶
氧化性分支 葡萄糖6-磷酸 + NADP <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ 6-磷酸葡萄糖酸-δ-内酯 + NADPH + H <sup>+</sup> 6-磷酸葡萄糖酸-δ-内酯 + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ 6-磷酸葡萄糖酸 + H <sup>+</sup> 6-磷酸葡萄糖酸 + NADP <sup>+</sup> $\rightarrow$ 核酮糖5-磷酸 + CO <sub>2</sub> + NADPH + H <sup>+</sup>	葡萄糖6-磷酸脱氢酶 内酯酶 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶
非氧化性分支 核酮糖5-磷酸 $\rightleftharpoons$ 核糖5-磷酸 核酮糖5-磷酸 $\rightleftharpoons$ 木酮糖5-磷酸 木酮糖5-磷酸 + 核糖5-磷酸 $\rightleftharpoons$ 景天庚酮糖7-磷酸 + 甘油醛3-磷酸 景天庚酮糖7-磷酸 + 甘油醛3-磷酸 $\rightleftharpoons$ 果糖6-磷酸 + 赤藓糖4-磷酸 木酮糖5-磷酸 + 赤藓糖4-磷酸 $\rightleftharpoons$ 果糖6-磷酸 + 甘油醛3-磷酸	磷酸戊糖异构酶 磷酸戊糖差向异构酶 转酮醇酶 转醛醇酶 转酮醇酶

### 戊糖磷酸途径的速率由NADP<sup>+</sup>的水平控制

戊糖磷酸途径的氧化性分支中的第一个反应，即葡萄糖6-磷酸的脱氢，实质上是不可逆的。事实上，在生理条件下这个反应是限速反应，它是控制部位。最重要的起调节作用的因素是NADP<sup>+</sup>的水平，NADP<sup>+</sup>是葡萄糖6-磷酸氧化为6-磷酸葡萄糖酸内酯的电子受体。还有，NADPH与NADP<sup>+</sup>竞相争夺与酶结合，ATP则与葡萄糖6-磷酸竞争。从饲养良好的大鼠肝得到的细胞溶质中NADP<sup>+</sup>与NADPH的比值约为0.014，要比NAD<sup>+</sup>与NADH的比值小好几个数量级，在同样条件下NAD<sup>+</sup>与NADH的比值为700。NADP<sup>+</sup>水平对氧化性分支的速率的显著影响保证了NADPH的产生与其在还原性生物合成中的利用密切偶联着。关于戊糖磷酸途径的非氧化性分支的控制尚无定论。

## 葡萄糖6-磷酸的去向决定于对 NADPH、核糖5-磷酸和ATP的需要量

让我们追踪四种不同情况下葡萄糖6-磷酸的去路：

1. 需要核糖5-磷酸比NADPH多得多 大部分葡萄糖6-磷酸通过糖酵解途径转变为果糖6-磷酸和甘油醛3-磷酸。然后转醛醇酶和转酮醇酶通过前述反应的逆转将两分子果糖6-磷酸和一分子甘油醛3-磷酸转变为三分子核糖5-磷酸。这种方式(图15-2A)的化学计算关系为：



2. 对NADPH和对核糖5-磷酸的需要是平衡的 在这种情况下主要的反应是通过戊糖磷酸途径的氧化性分支由葡萄糖6-磷酸形成两个NADPH和一个核糖5-磷酸。这种方式(图15-2B)的化学计算关系为：

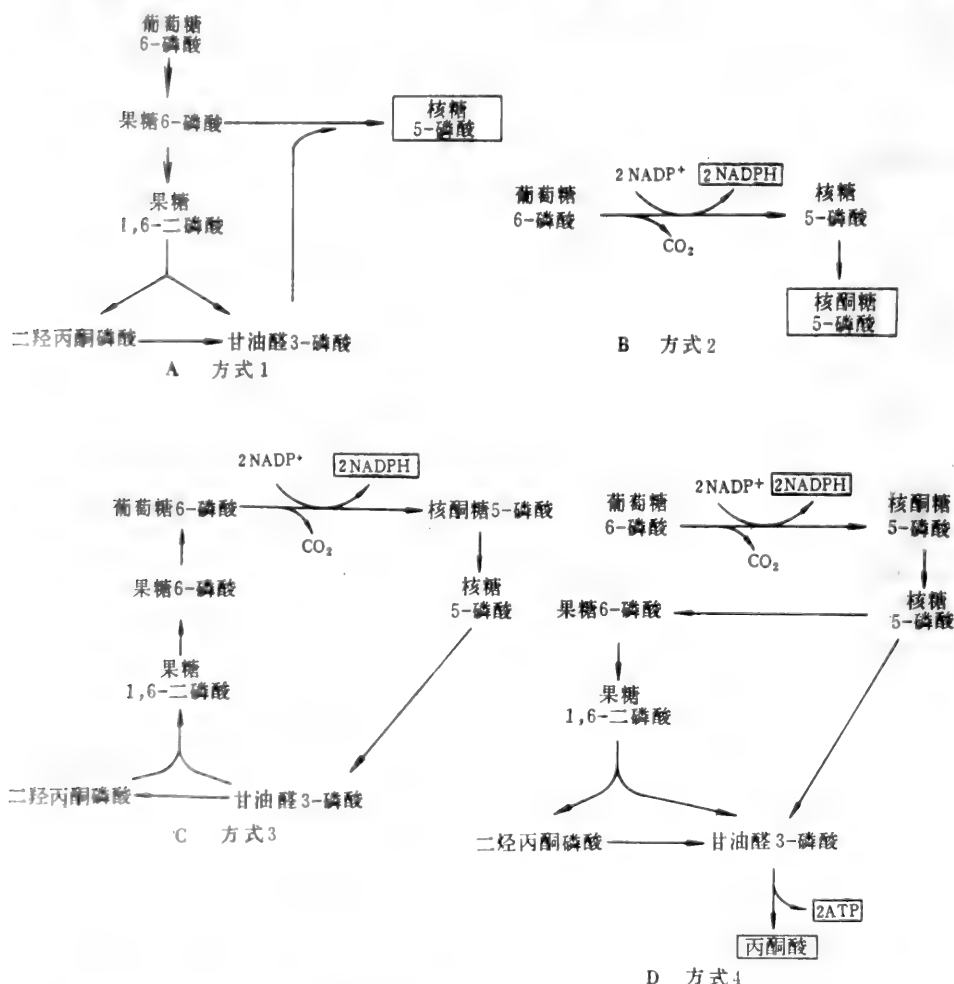
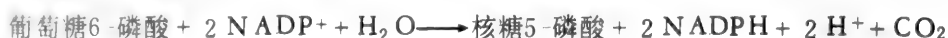
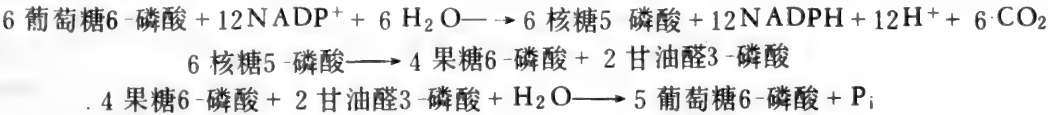


图15-2 戊糖磷酸途径的四种方式。主要产物加框示出。

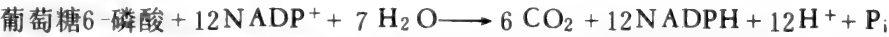
需要NADPH比核糖5-磷酸多得多：葡萄糖6-磷酸完全被氧化为CO<sub>2</sub>。在这种情况下



下有三组反应起作用。第一,由戊糖磷酸途径的氧化性分支形成两个NADPH和一个核糖5-磷酸。然后,核糖5-磷酸由转酮醇酶和转醛醇酶的作用转变为果糖6-磷酸和甘油醛3-磷酸。最后,由葡糖异生途径(在本章后文讨论)把果糖6-磷酸和甘油醛3-磷酸再合成为葡萄糖6-磷酸。这三组反应(图15-2C)的化学计算关系为:



这些反应的总和为:



因此,这相当于一个葡萄糖6-磷酸完全氧化为CO<sub>2</sub>,同时产生NADPH。这些反应的实质是戊糖磷酸途径所产生的核糖5-磷酸通过转酮醇酶、转醛醇酶以及葡糖异生途径中的某些酶而再循环至葡萄糖6-磷酸。

4. 需要NADPH比核糖5-磷酸多得多:葡萄糖6-磷酸转变为丙酮酸 另一种途径是,戊糖磷酸途径的氧化性分支所产生的核糖5-磷酸可能转变为丙酮酸(图15-2D)。由核糖5-磷酸衍生的果糖6-磷酸和甘油醛,3-磷酸沿着糖酵解途径向下转变,而不是回到葡萄糖6-磷酸。在这种方式中,同时产生ATP和NADPH,而葡萄糖6-磷酸的六个碳中有五个进入了丙酮酸:



这些反应所形成的丙酮酸可被氧化以产生更多的ATP,或者作为建造元件用于各种生物合成。

### 戊糖磷酸途径在脂肪组织中 比在肌肉中活跃得多

有多少葡萄糖6-磷酸是通过戊糖磷酸途径被代谢的,又有多少是通过糖酵解和柠檬酸循环的共同作用而被代谢的?放谢性标记的实验能对此提出估计。将一份组织匀浆与在C-1上为<sup>14</sup>C标记的葡萄糖一起保温,将另一份与在C-6上为<sup>14</sup>C标记的葡萄糖共同保温。然后比较这两个样品所产生的CO<sub>2</sub>的放射性。这种实验的合理的结果是,通过戊糖磷酸途径时只有C-1被脱羧;而当葡萄糖通过糖酵解途径,丙酮酸脱氢酶复合物和柠檬酸循环被代谢时,则C-1和C-6以同样的程度被脱羧。在后一组反应中C-1和C-6之所以相当是因为甘油醛3-磷酸和二羟丙酮磷酸可通过丙糖磷酸异构化酶而迅速相互转变。

这种实验探讨已证明在骨骼肌中戊糖磷酸途径的活性非常低,而在脂肪组织中非常高。这项发现支持了

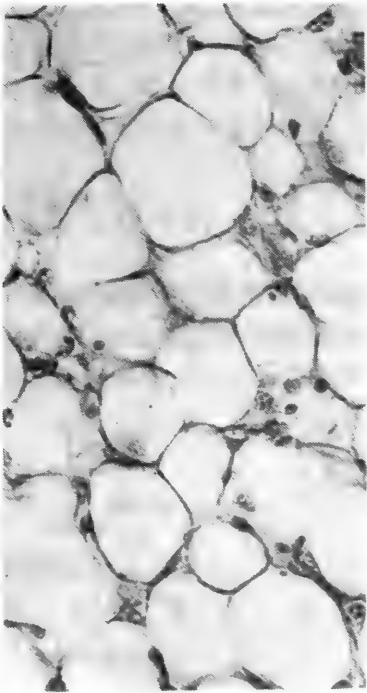
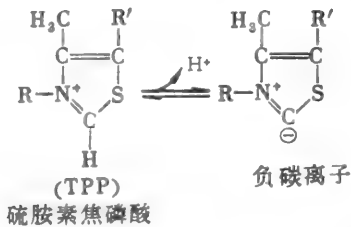


图15-3 脂肪组织的光学显微照片。

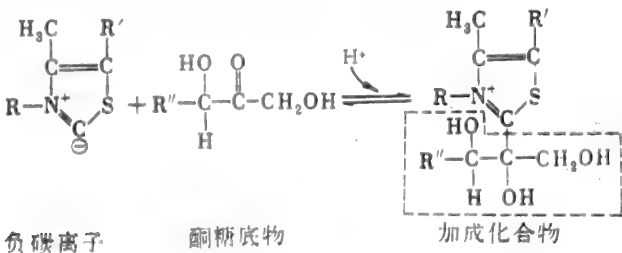
列概念：戊糖磷酸途径的主要作用是产生 NADPH 用于还原性的生物合成。脂肪组织中要将大量的 NADPH 消耗于从乙酰 CoA 到脂肪酸的还原性生物合成（见第 17 章）。

### 转酮醇酶的辅基 TPP 传递活化的醛类

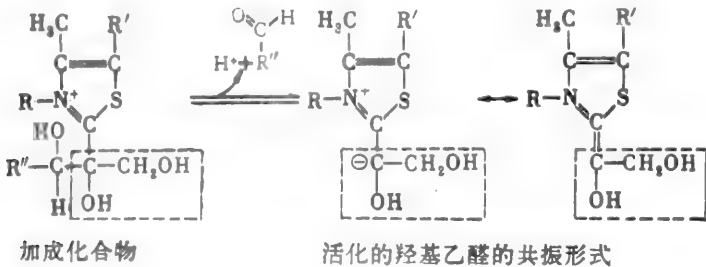
转酮醇酶有一与之牢固结合的硫胺素焦磷酸（TPP）作为其辅基。前面在丙酮酸脱氢酶复合物所催化的丙酮酸脱羧作用中已遇到过这种辅基。转酮醇酶催化作用的机理与丙酮酸脱羧相似之处在于都是一个活化的醛单位被转移给一个受体。转酮醇酶反应中的受体是一个醛



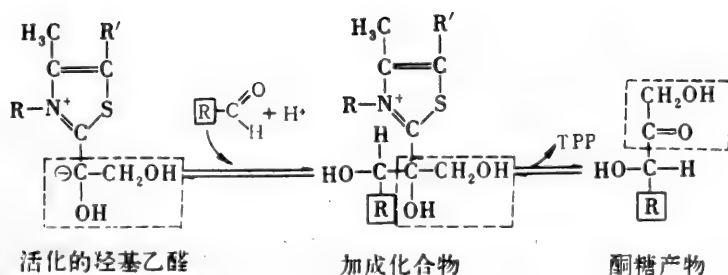
糖，而丙酮酸脱氢反应中它是硫辛酰胺。在两个反应中，酮基底物加成的部位都是辅基的噻唑环。C 2 的碳原子酸性极强，易于电离产生负碳离子。这一负碳离子加到酮糖底物（例如，木酮糖 5-磷酸，果糖 6-磷酸和景天庚酮糖 7-磷酸）的羰基上。



这种加成化合物丢失其 R—CHOH 部分，产生一带负电荷的、活化的羟基乙醛单位。噻唑环中带正电荷的氮起着电子陷阱的作用，促使活化的中间产物上生出一个负电荷来。然后一个



合适的醛受体的羰基与活化的羟基乙醛单位缩合，形成一个新的酮糖，并从酶上释放出来。

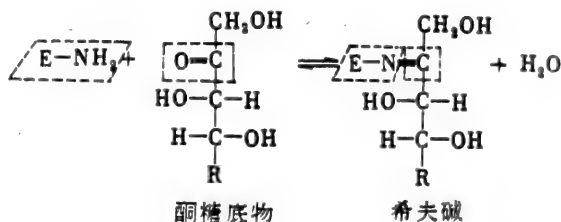


不能与TPP结合的转酮醇酶能引起精神病

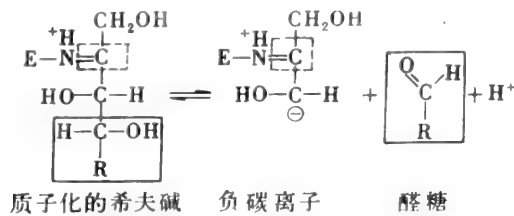
维尔尼克-柯尔萨科夫综合症(Wernicke Korsakoff syndrome)是一种严重的精神病,是由对它敏感的人在饮食中缺乏硫胺素引起的。此病的特征是眼睛的运动麻痹,站立和走步都不正常,精神功能显著紊乱。特别是这种病人不能辨认方向,记忆力严重减退。已经知道只有一小部分嗜酒成性的人和终年营养不良的人会得这种病。还有,在饮食中缺乏硫胺素时欧洲人比非欧洲人得这种病的可能性大得多。这些观察说明遗传因子可能是重要的决定性因素,它决定缺乏硫胺素的人是否会得维尔尼克-柯尔萨科夫综合症。近年来关于培养的成纤维细胞中转酮醇酶的研究证明,事实上正是这种情况。从维尔尼克-柯尔萨科夫综合症的病人得到的转酮醇酶在结合硫胺素焦磷酸的活力上是正常人的这种酶的十分之一以下。在这种病人体内,另外两种依赖于硫胺素的酶,即丙酮酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶,却是正常的。只有当硫胺素焦磷酸的水平低到不能使酶饱和时在临床上才看得到转酮醇酶的异常。这是一个明确的例子,说明遗传因素和环境因素在产生疾病方面的相互作用。维尔尼克-柯尔萨科夫综合症也生动地说明,单独一种酶活性的降低能够在神经上和行为上产生严重的后果。

转醛醇酶以希夫碱的形式携带活化的二羟丙酮

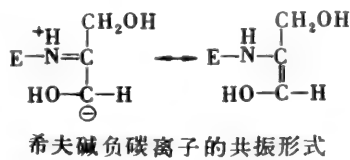
转醛醇酶把一个三碳的二羟丙酮单位从一个酮糖供体转移给醛糖的受体。转醛醇酶与转酮醇酶不同,它并不含有辅基。而是在酮糖底物的羰基与酶的作用部位的赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基之间形成希夫碱。这种共价的酶-底物(E-S)中间产物就像糖酵解途径中果糖二磷酸醛缩酶反应中所形成的一样。



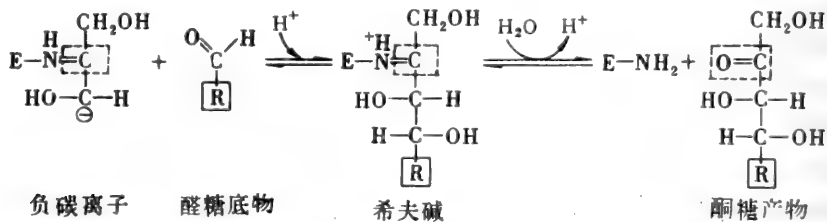
希夫碱被质子化，C-3与C-4间的键断裂，释放出醛糖。



二羟丙酮部分上的负电荷因共振而稳定。于是希夫碱的带正电荷的氮原子就起着电子坑 (electron sink) 的作用。转醛醇酶中这一氮原子和转酮醇酶中噻唑环中的氮起着同样的作用。



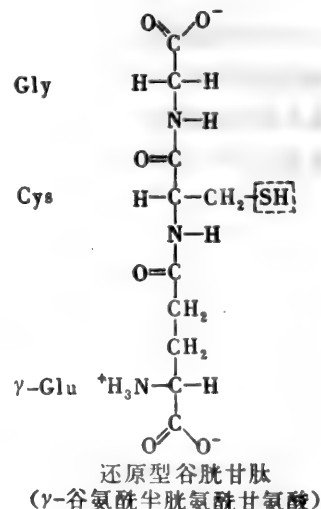
在一适当的醛糖被结合之前，二羟丙酮与转醛醇酶之间的希夫碱一直是稳定的。结合后则二羟丙酮部分的负碳离子与醛糖的羰基起作用。希夫碱的水解使酮糖产物释放出来。



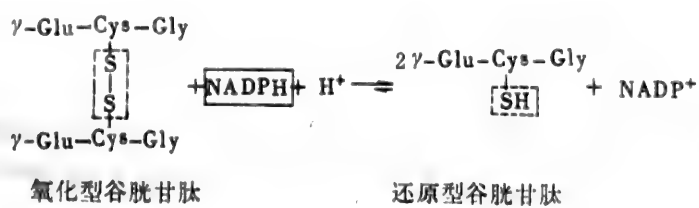
### 葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏引起一种 由药物诱发的溶血性贫血

1926年发明了一种抗疟药物帕马奎因 (pamaquine)。大多数病人能够耐受这种药物，但有少数病人在治疗开始后几天之内就发生严重的病症。尿变黑，发生黄疸，血液中血红蛋白含量急剧下降。在某些情况下，红血细胞的大量破坏引起死亡。

这种由药物引起的溶血性贫血的原因于1956年得到阐明。主要的问题是红细胞中葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏。红细胞中NADPH的唯一来源是戊糖磷酸途径，所以葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏会使NADPH的产生减少。红细胞中NADPH



的主要作用是把谷胱甘肽的二硫化物形式还原为硫氢基形式。这一反应是由谷胱甘肽还原酶所催化的。



还原型谷胱甘肽是一种带有游离的硫氢基的三肽，它起着硫氢基缓冲剂的作用，使血红蛋白和红细胞中其它蛋白质的半胱氨酸残基保持着还原态。谷胱甘肽的还原型（GSH）和氧化型（GSSG）的比值通常为500左右。还原型谷胱甘肽也起解毒作用，因它与过氧化氢或其它有机过氧化物反应。



还原型谷胱甘肽似乎是维持红细胞的正常结构和使血红蛋白保持在亚铁状态所必需的。还原型谷胱甘肽含量低的细胞对溶血作用较为敏感，其原因尚不清楚。在没有还原型谷胱甘肽时，像巴马奎因这样的药物会使红细胞的表面变形，这就使得红细胞易被破坏，也易被脾脏移去。这些药物也增加有毒的过氧化物的形成，在正常情况下则过氧化物与还原型谷胱甘肽发生反应而被除去。

缺乏葡萄糖6-磷酸脱氢酶并不是稀见的疾病。它是具有性联特性的遗传病。女性的杂合子有两类红细胞，一类具有正常的酶活性，而另一类则缺乏葡萄糖6-磷酸脱氢酶。大多数其它器官中的葡萄糖6-磷酸脱氢酶是由另一个基因所特定的。最常见的（A型的）葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏症以红细胞中的酶活性降低至十分之一为特征，在美国黑人中其发生率为11%。这样高的频率说明这种缺乏症在某些环境条件下可能是有利的。事实上，红细胞中葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏似乎能保护人体，使免于镰刀型疟疾（falciparum malaria），因为引起这种疾病的寄生物需要戊糖磷酸途径和还原型谷胱甘肽才有最适的生长。于是，葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏和镰刀形细胞的特性是并行的机理，都保护人体使免遭疟疾之害，这就对世界上疟疾流行的地区其基因频率较高作了说明。

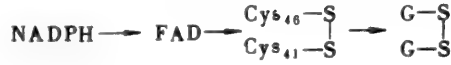
葡萄糖6-磷酸脱氢酶缺乏症的存在清楚地说明对药物的异常反应可能有遗传上的原因。这种遗传的酶的缺乏在不施用某些药物时，是比较无害的。这里我们又看到遗传性和环境在产生疾病方面的相互作用。半乳糖血症（galactosemia）、遗传性的对果糖的不耐受性、苯酮尿（phenylketonuria）和琥珀酰胆碱的敏感性也都显著地说明了这种相互作用。

### 谷胱甘肽还原酶通过FAD

把电子从NADPH传递给氧化型谷胱甘肽

还原型谷胱甘肽的再生是由谷胱甘肽还原酶所催化的，它是50kda1的亚基的二聚体。来自NADPH的电子并不是直接传递给氧化型谷胱甘肽中的二硫键，而是先从NADPH传递到

牢固结合的黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)，然后再传递到亚基中两个半胱氨酸残基之间的二硫键，最后再传递到氧化型谷胱甘肽。



每一亚基是由三种结构域组成的：与FAD结合的结构域，与NADPH结合的结构域和一个界面结构域 (图15-4)。FAD结构域和NADP<sup>+</sup>结构域彼此相似，也和其它脱氢酶中与核苷酸结合

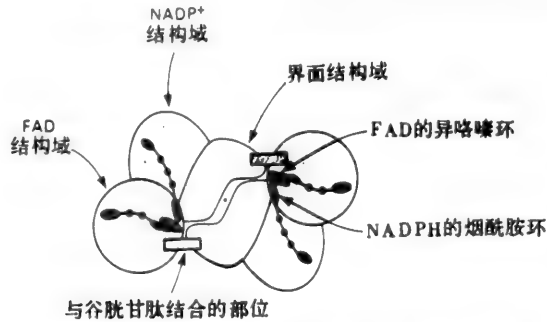


图15-4 谷胱甘肽脱氢酶各结构域示意图。这种二聚体的酶中的每一个亚基都由三部分组成：NADP<sup>+</sup>结构域、FAD结构域和界面结构域。谷胱甘肽结合在一个亚基的FAD结构域上和另一个亚基的界面结构域上。[依据G. E. Schultz, R. H. Schirmer, W. Sachsenheimer, and E. F. Pai, *Nature* 273 (1978):123.]

的结构域类似。FAD和NADP<sup>+</sup>都是以拉开的方式结合着的，它们的异咯嗪环和烟酰胺环彼此相邻 (图15-4)。值得注意的是氧化型谷胱甘肽的结合部位是由一个亚基的FAD结构域和另一个亚基的界面结构域所形成的。

### 葡萄糖可由非糖的前体合成

我们现在来讨论由非糖的前体合成葡萄糖的过程，这叫作葡糖异生作用。这种代谢过程是非常重要的，因为某些组织，例如脑，几乎完全是以葡萄糖为主要燃料的。典型的成年人的脑每天所需要的葡萄糖约为120克，这占了整个躯体每天所需要的160克葡萄糖的大部分。体液中存在的葡萄糖的量约为20克，而来自糖原 (葡萄糖的贮存形式，272页) 的迅即可利用的葡萄糖约为190克。因此，直接的贮存的葡萄糖足以满足大约一天中葡萄糖的需要。在饥饿时间较长时，就必须从非糖的来源形成葡萄糖以保证存活。在剧烈运动时葡糖异生作用也是重要的。

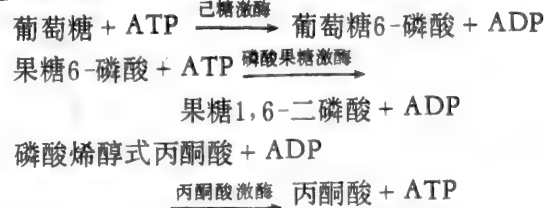
葡萄糖的主要非糖前体是乳酸、氨基酸类和甘油。乳酸是由活动剧烈的骨骼肌形成的，这时糖酵解的速率超过了柠檬酸循环和呼吸链 (207页) 的代谢速率。氨基酸是由饮食中的蛋白质衍生而来的，在饥饿过程中则由骨骼肌中的蛋白质分解而来 (428页)。脂肪细胞中三酰基甘油的水解 (293页) 产生甘油和脂肪酸。甘油是葡萄糖的前体，但在动物体内脂肪酸不能转变为葡萄糖，其理由将在以后讨论 (301页)。葡糖异生途径将丙酮酸转变为葡萄糖。主要的进入点是丙酮酸、草酰乙酸和二羟丙酮磷酸 (图15-5)。

葡糖异生的主要场所是肝脏。葡糖异生也发生在肾脏皮质中，但此处所形成的葡萄糖的总量约为肝脏中所形成葡萄糖的十分之一，因为肾脏质量比较小。脑、骨骼肌或心肌中极少

发生葡糖异生作用。肝脏和肾脏中的葡糖异生作用有助于保持血液中葡萄糖的水平，因此脑和肌肉可以从血液中汲取足够量的葡萄糖以满足它们代谢的需要。

### 葡糖异生并非糖酵解的逆转

在糖酵解中，葡萄糖转变为丙酮酸；而在葡糖异生作用中，则丙酮酸转变为葡萄糖。然而，葡糖异生并非糖酵解的逆转。因为糖酵解的热力学平衡远远偏于丙酮酸的形成方面，所以葡糖异生需要一种不同的途径。在典型的细胞条件下，从葡萄糖形成丙酮酸的实际的  $\Delta G$  约为  $20 \text{ kcal/mol}$  (205页)。糖酵解中自由能的减少大多发生在由己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶所催化的三个实质上不可逆的步骤中。



在葡糖异生中，糖酵解中这三个实质上不可逆的反应是通过下列新的步骤而绕过来的：

#### 1. 磷酸烯醇式丙酮酸是通过草酰乙酸而由丙

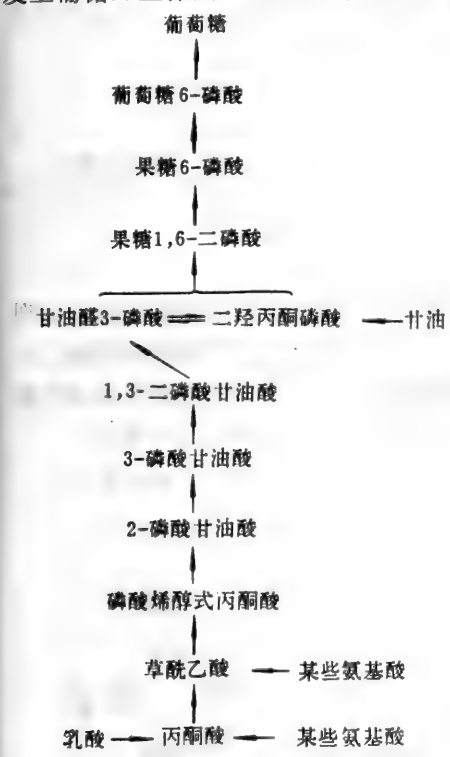
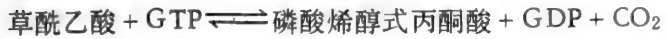
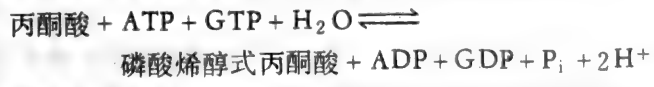


图15-5 葡糖异生途径。这一途径中特征性反应以粗箭头表示。其它反应与糖酵解的相同。葡糖异生作用的酶位于细胞溶质中，但丙酮酸羧化酶（在线粒体中）和葡萄糖6-磷酸酶（连在内质网上）除外。图示乳酸、甘油和氨基酸类的进入点。

酮酸形成的 首先，丙酮酸消耗一分子ATP而被羧化为草酰乙酸。然后，草酰乙酸又消耗第二个高能磷酸键而脱羧并磷酸化，产生磷酸烯醇式丙酮酸。

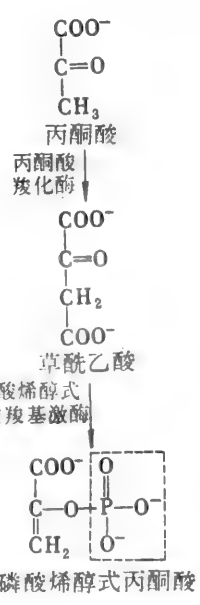


第一个反应是由丙酮酸羧化酶催化的，第二个反应是由磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶催化的。这两个反应的总和是：



由丙酮酸形成磷酸烯醇式丙酮酸的这一途径在热力学上是可能的，因为  $\Delta G^{\circ'}$  为  $+0.2 \text{ kcal/mol}$ ，与丙酮酸激酶所催化的反应不同，那是  $+7.5 \text{ kcal/mol}$ 。这一有利得多的  $\Delta G^{\circ'}$  来源于多输入的一个高能磷酸键。

#### 2. 果糖6-磷酸是由果糖1,6-二磷酸通过C-1上磷酸酯键的水解而形成的 果糖1,6-二磷酸酶催化这一放能的水解反应。



3. 葡萄糖是由葡萄糖6-磷酸的水解形成的 此反应由葡萄糖6-磷酸酶催化

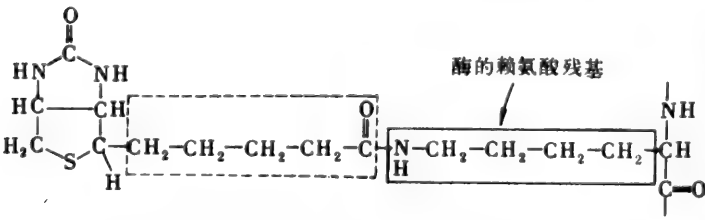
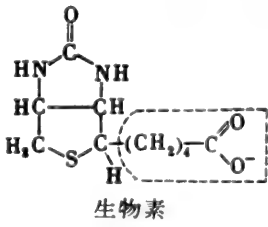
葡萄糖6-磷酸 + H<sub>2</sub>O → 葡萄糖 + P<sub>i</sub>  
 葡萄糖6-磷酸酶结合在内质网上并作用于细胞溶质中的底物上。这种酶不存在于脑和肌肉中；因此，葡萄糖不离开这些器官。

表15-2 糖酵解与葡萄糖异生在酶方面的差异

糖 酵 解	葡 萄 糖 异 生
己糖激酶	葡萄糖6 磷酸酶
磷酸果糖激酶	果糖1,6-二磷酸酶
丙酮酸激酶	丙酮酸羧化酶
	磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶

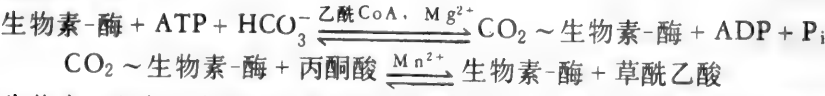
生物素是活化的CO<sub>2</sub>的可移动的载体

1960年厄特尔, M. (Merton Utter) 由于发现线粒体能够使丙酮酸形成草酰乙酸而发现了丙酮酸羧化酶。由于这种酶的催化特性和变构特性,它具有特殊的意义。丙酮酸羧化酶有一共价联结着的辅基——生物素,它起着活化的CO<sub>2</sub>的载体的作用。生物素的羧基末端通过酰胺键而连结在特定的赖氨酸残基的ε-氨基上。

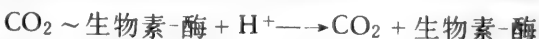
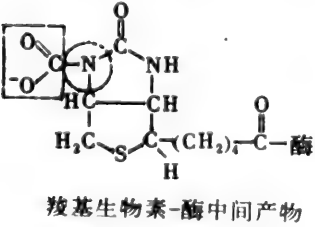


注意生物素是通过一条长的灵活的链连在丙酮酸羧化酶上的, 就像丙酮酸脱氢酶复合物中的硫辛酰胺一样。

丙酮酸的羧化分两步进行:



羧基生物素-酶中间产物中的羧基与生物素环中N-1氮原子成键。这种羧基生物素中间产物中的羧基是活化的。其断裂的ΔG°' 为 -4.7kcal/mol。

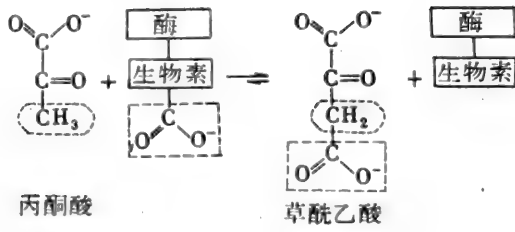


这就使得羧基生物素能在不输入外加自由能的条件下把CO<sub>2</sub>传递给受体。

然后活化的羧基从羧基生物素上传递给丙酮酸而形成草酰乙酸。生物素和酶之间的长而灵活的纽带使得这种辅基从酶的一个活性部位 (ATP·重碳酸根部位) 旋转到另一个活



性部位（丙酮酸部位）上去。



### 丙酮酸羧化酶为乙酰CoA所活化

丙酮酸羧化酶的活性决定于乙酰CoA的存在。除非乙酰CoA（或与乙酰CoA极为相近的酰基CoA分子）结合在酶上面，否则生物素不能被羧化。第二步反应不受乙酰CoA的影响。

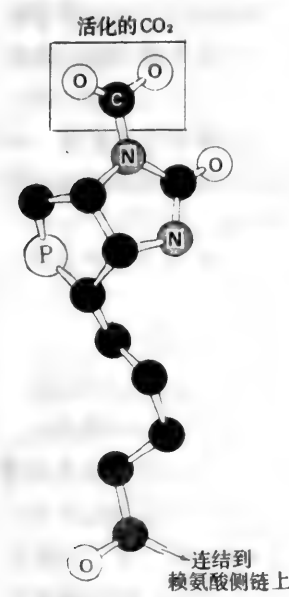


图15-6 羧基生物素的分子模型。

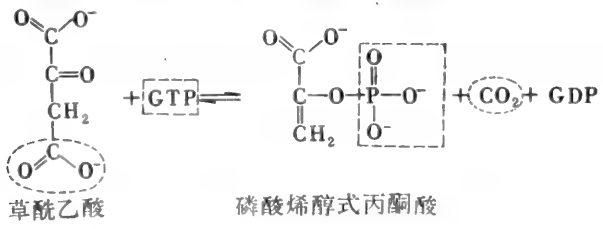
丙酮酸羧化酶被乙酰CoA所变构活化是一种重要的生理控制机理。丙酮酸羧化酶反应的产物草酰乙酸既是葡糖异生作用中化学计算上的中间产物，又是柠檬酸循环的催化性中间产物。乙酰CoA的重多就是需要更多草酰乙酸的信号。如果ATP有富余，草酰乙酸就可在葡糖异生中被消耗。如果ATP不足，草酰乙酸就会与乙酰CoA缩合而进入柠檬酸循环。

因此，丙酮酸羧化酶不仅在葡糖异生中是重要的，而且在维持柠檬酸循环中间产物的水平方面也起着关键性的作用。这些中间产物需要得到补充，因为它们也消耗于某些生物合成反应中，例如血红蛋白的合成中。丙酮酸羧化酶的作用称为回补作用，意思是填补。

### 草酰乙酸通过穿梭进入细胞溶质并转变为磷酸烯醇式丙酮酸

丙酮酸羧化酶是线粒体中的酶，而葡糖异生中的其它酶都是细胞质中的。丙酮酸羧化酶反应的产物草酰乙酸以苹果酸的形式通过线粒体膜被运出。在线粒体内草酰乙酸被NADH-苹果酸脱氢酶还原为苹果酸。苹果酸被载体运过线粒体膜并在细胞溶质中再被NAD<sup>+</sup>-苹果酸脱氢酶氧化为草酰乙酸。

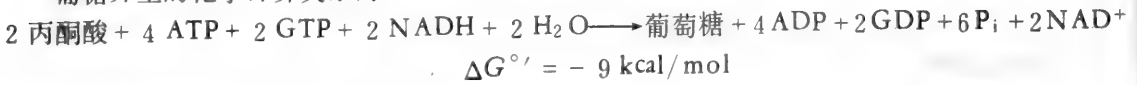
草酰乙酸在细胞溶质中被磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶同时脱羧并磷酸化。



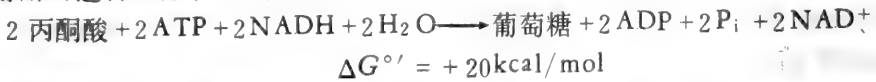
被丙酮酸羧化酶加到丙酮酸上的 $\text{CO}_2$ 在这一步骤中又掉下来了。事实上，磷酸化反应正是由于这一同时发生的脱羧作用而成为在力能学上有利的反应。脱羧作用常常推动一些不脱羧就会高度吸能的反应。在脂肪酸合成中我们会再次遇到这种设计。

### 从丙酮酸合成葡萄糖消耗六个高能磷酸键

葡糖异生的化学计算关系为：



反之，糖酵解的逆转的化学计算关系为：



注意，在葡糖异生中由丙酮酸合成葡萄糖利用了六个高能磷酸键，而在糖酵解中葡萄糖转变为丙酮酸时只产生两分子ATP。因此，葡糖异生作用的额外代价是由丙酮酸合成一个葡萄糖要四个高能磷酸键。这四个额外的高能磷酸键是用来把一个热力学上不利的过程（糖酵解的逆转， $\Delta G^{\circ'} = +20 \text{ kcal/mol}$ ）变为热力学上有利的过程（葡糖异生， $\Delta G^{\circ'} = -9 \text{ kcal/mol}$ ）。考虑糖酵解和葡糖异生之间的差别的另一种方法就是回忆一下输入一个ATP当量就会使一个反应的平衡常数改变约 $10^8$ 倍（185页）。因此，向葡糖异生作用输入四个额外的高能键将使其平衡常数改变 $10^{32}$ 倍，这就使丙酮酸转变为葡萄糖在热力学上成为可能。

### 葡糖异生和糖酵解互相调节

葡糖异生和糖酵解是协调的，所以当一条途径比较不活跃时，另一条途径却非常活跃。假若两组反应同时都非常活跃，那么其净结果是每一反应循环水解四个 $\sim\text{P}$ （两个ATP加上两个GTP）。在细胞的条件下，糖酵解和葡糖异生二者都是高度放能的，因此对于这种循环没有什么热力学上的障碍。可是，每条途径所特有的酶的活性是受到控制的，因而这两条途径不可能同时都非常活跃。例如，AMP促进磷酸果糖激酶（205页）而抑制果糖1,6-二磷酸酶。柠檬酸对这两种酶的影响恰好与AMP相反。结果是，当细胞的能荷低时，糖酵解中的限速步骤果糖6-磷酸的磷酸化被促进。反之，当能荷高而且柠檬酸循环的中间产物丰富时，果糖1,6-二磷酸被水解而葡糖异生被促进。丙酮酸激酶（203页）和丙酮酸羧化酶（267页）也受到彼此相反的调节。果糖1,6-二磷酸促进而ATP抑制丙酮酸激酶，但乙酰CoA促进而ADP抑制丙酮酸羧化酶。因此，当肝细胞中燃料分子和ATP都多时，丙酮酸源源不断地变成磷酸烯醇式丙酮酸而葡糖异生受到促进。

### 底物循环放大代谢信号并产生热

象果糖6-磷酸磷酸化为果糖1,6-二磷酸和后者又水解为果糖6-磷酸这样一对反应称为一个底物循环。如前已指出的，由于彼此相反的变构控制，在大多数细胞中这两个反应不会同时都是充分活跃的。不过，同位素标记的研究已证明在葡糖异生过程中也发生果糖6-磷酸的

磷酸化。在其它彼此相反的不可逆的反应中也发生有限度的底物循环。这种循环常被认为是代谢控制中的缺陷，因此，底物循环有时称为无效循环 (futile cycle)。不过，目前看来，更可能的是底物循环在生物学上是重要的。一种可能性是底物循环放大代谢的信号。假定A转变为B的速率为100，而B转变为A的速率为90，起始的净输出量为10。假定一种变构效应剂使A→B的速率增加20%即变为120，相反地使B→A的速率减少20%即变为72。新的净输出量为48，因此，相反的反应速率变化20%却导致总输出量增加480%。图15-7所示的例子中，这种放大是由ATP的水解完成的。

底物循环的另一潜在的生物学作用是由ATP的水解产生热。野蜂是一个突出的例子，它们必须将胸部的温度维持在30℃以上以便飞行。即使在周围的温度只有10℃时，野蜂也能维持这样高的胸部温度并找到食物，因为其飞翔肌肉中的磷酸果糖激酶和果糖二磷酸酶同时都是活性非常高的。这种果糖二磷酸酶不为AMP所抑制，这说明这种酶是为产生热专门设计的。反之，蜜蜂的飞翔肌肉中几乎没有果糖二磷酸酶，当然在周围温度低时就不能飞翔。由于果糖6-磷酸和果糖1,6-二磷酸之间的循环速率太高也能发生过量的产生。一种麻醉药氟氯溴乙烷 (halothane) 会使一种敏感的猪品系产生这种情况，称为恶性体温过高。

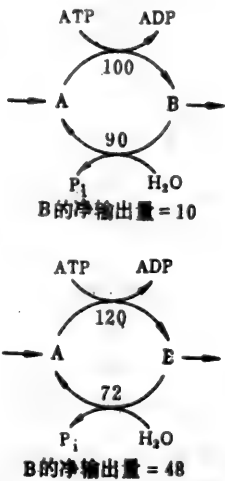
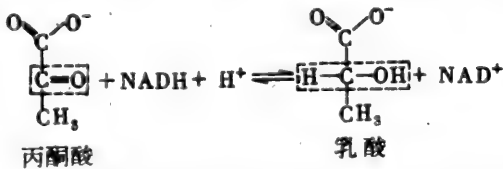


图15-7 ATP推动的底物循环一例，以两种不同的速率进行。两个相反的反应在速率上有较小变化就使产物B的输出量有较大变化。

### 收缩的肌肉所产生的乳酸被肝脏转变为葡萄糖

葡糖异生的一种主要的原料就是活跃的骨骼肌所产生的乳酸。在无氧条件下，收缩的骨骼肌中由糖酵解产生丙酮酸的速率超过了丙酮酸被柠檬酸循环氧化的速率。其次，在活跃的肌肉中，糖酵解中NADH形成的速率也大于呼吸链中其氧化的速率。糖酵解的继续不断的进行依赖于NAD<sup>+</sup>的供应，NAD<sup>+</sup>是氧化甘油醛3-磷酸的。这是由乳酸脱氢酶完成的，它使丙酮酸还原为乳酸，而将NADH氧化为NAD<sup>+</sup>。

乳酸是代谢作用的盲端。它必须再转变为丙酮酸，否则不能被代谢。丙酮酸还原为乳酸



的唯一目的就是再生NAD<sup>+</sup>，以便糖酵解能在活跃的骨骼肌中继续进行。乳酸的形成赢得了时间并且将部分的代谢负担从肌肉转嫁给肝脏。

大多数细胞的质膜都是乳酸和丙酮酸极易透过的。这两种物质都从活跃的骨骼肌中扩散到血液中并被带入肝脏。被运送的乳酸要比丙酮酸多得多，因为收缩中的肌肉中NADH/NAD<sup>+</sup>

的比值高。进入肝脏的乳酸被氧化成丙酮酸，肝脏的细胞溶质中 $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ 的低比值有利于这一反应。然后丙酮酸通过肝脏中的葡糖异生途径转变为葡萄糖。葡萄糖再进入血液并被骨骼肌吸收。这样，肝脏给收缩中的肌肉提供葡萄糖，肌肉则由于糖酵解中葡萄糖转变为乳酸而产生ATP。然后肝脏又再从乳酸合成葡萄糖。这些转变就组成了科里（Cori）循环（图15-8）。

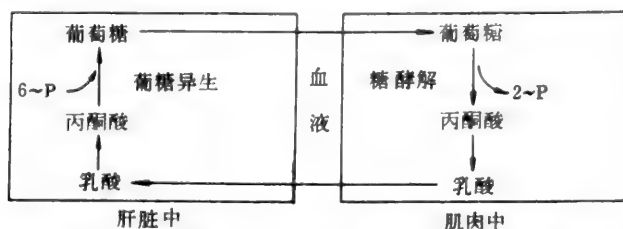


图15-8 科里循环。活跃的肌肉所形成的乳酸被肝脏转变为葡萄糖。这一循环把活跃的肌肉的部分代谢负担转嫁给肝脏。

这些转变是由骨骼肌和肝脏中乳酸脱氢酶催化性质上的差异促成的。乳酸脱氢酶是一个四聚体，其亚基为35kdaI。有两种多肽链，称为M和H，它们能形成五种类型的四聚体： $\text{M}_4$ ， $\text{M}_3\text{H}_1$ ， $\text{M}_2\text{H}_2$ ， $\text{M}_1\text{H}_3$ 和 $\text{H}_4$ 。这些东西称为同功酶。 $\text{M}_4$ 同功酶对丙酮

酸的亲和力比 $\text{H}_4$ 同功酶的高得多。其它同功酶的亲和力居间。骨骼肌和肝脏中主要的同功酶是 $\text{M}_4$ ，而心肌中的是 $\text{H}_4$ 。对这些同功酶已有详尽的研究，但存在这么多种形式的理由仍是一个谜。

## 概 要

戊糖磷酸途径在细胞溶质中产生NADPH和核糖5-磷酸。NADPH用于还原性的生物合成，而核糖5-磷酸则用于RNA，DNA和核苷酸辅酶的合成。戊糖磷酸途径始于葡萄糖6-磷酸的脱氢，形成一内酯，内酯又水解成6-磷酸葡萄糖酸，此糖酸再发生氧化性脱羧，产生核酮糖5-磷酸。在这两个氧化反应中 $\text{NADP}^+$ 都是电子受体。最后一步是核酮糖5-磷酸（酮糖）异构化为核糖5-磷酸（醛糖）。当细胞所需要的NADPH比核糖5-磷酸多得多时，另一种方式的途径就活跃起来。在这些情况下，核糖5-磷酸被转酮醇酶和转醛醇酶转变为甘油醛3-磷酸和果糖6-磷酸。转酮醇酶含有TPP，这是它的辅基。这些酶创造了一种戊糖磷酸途径与糖酵解之间的可逆的联系。木酮糖5-磷酸、景天庚酮糖7-磷酸和赤藓糖4-磷酸就是这些相互转变的中间产物。通过这一途径，每有一个葡萄糖6-磷酸完全氧化为 $\text{CO}_2$ 时就产生十二个NADPH。当需要合成的核糖5-磷酸比NADPH多得多时，那就只有这一途径的非氧化性分支起作用。在这些情况下，果糖6-磷酸和甘油醛3-磷酸（由糖酵解途径形成的）转变为核糖5-磷酸，而没有NADPH的形成。另一方面，氧化性分支所形成的核糖5-磷酸也可通过果糖6-磷酸和甘油醛3-磷酸而转变为丙酮酸。在这种方式下，有ATP和NADPH生成，而且葡萄糖6-磷酸的六个碳中有五个出现在丙酮酸中。糖酵解途径和戊糖磷酸途径的相互作用可以调节NADPH、ATP和如核糖5-磷酸以及丙酮酸这样一些构造单元的水平，以满足细胞的需要。

葡糖异生是指由非糖的原料如乳酸、氨基酸类和甘油合成葡萄糖。丙酮酸是一个主要的起点，使丙酮酸转变为葡萄糖的几个反应是和糖酵解共有的。然而，葡糖异生却需要四个新的反应以便绕过糖酵解中实质上不可逆的相应的反应。在线粒体中丙酮酸羧化为草酰乙酸，在细胞溶质中草酰乙酸又脱羧并磷酸化为磷酸烯醇式丙酮酸。在这些反应中消耗两个高能磷酸键，它们是由丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶所催化的。丙酮酸羧化酶含有生物

素作为辅基。葡糖异生的其它特有的反应为果糖1,6 二磷酸的水解和葡萄糖6 磷酸的水解, 它们是由专门的磷酸酶催化的。葡糖异生和糖酵解是相互调节的, 所以当一条途径活性特别高时, 另一条途径的活性就相对地低。

## 习 题

1. 由葡萄糖6 磷酸合成核糖5 磷酸而不同时产生NADPH的化学计算关系式是什么? 由葡萄糖6 磷酸合成NADPH而不同时形成戊糖的化学计算关系式是什么?
2. 向含有戊糖磷酸途径的氧化性分支的酶和辅助因子的溶液中加入在C 6上被 $^{14}\text{C}$ 标记的葡萄糖。放射性标记的命运如何?
3. 柠檬酸循环中的哪一个反应最象6 磷酸葡萄糖酸氧化脱羧为核酮糖5 磷酸的反应? 在这两个反应中形成了哪一类与酶结合的中间产物?
4. 向含有转酮醇酶、转醛醇酶、磷酸戊糖差向异构酶、磷酸戊糖异构化酶和甘油醛3 磷酸的溶液中加入在C 1上为 $^{14}\text{C}$ 所标记的核糖5 磷酸。在此反应混合物中形成的赤藓糖4 磷酸和果糖6 磷酸中放射性标记的分布如何?
5. 鸡蛋清中的抗生物素蛋白是70kda的蛋白质, 它对生物素的亲和力极高。事实上, 它是含生物素的酶类的一种高度专一的抑制剂。将抗生物素蛋白加于细胞匀浆中时, 下列转变中的哪个会被阻断?
  - (a) 葡萄糖  $\rightarrow$  丙酮酸
  - (b) 丙酮酸  $\rightarrow$  葡萄糖
  - (c) 草酰乙酸  $\rightarrow$  葡萄糖
  - (d) 葡萄糖  $\rightarrow$  核糖5 磷酸
  - (e) 丙酮酸  $\rightarrow$  草酰乙酸
  - (f) 核糖5-磷酸  $\rightarrow$  葡萄糖
6. 设计一个化学实验来鉴定在转醛醇酶的活性部位形成希夫碱的赖氨酸残基。  
另外的习题, 参看W. B. Wood, J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 9.

## 第16章 糖原和双糖代谢

糖原是葡萄糖的极易动员的贮藏形式。它是葡萄糖残基的很大而又分支的高聚物（图16-1）。糖原中的大部分葡萄糖残基是由 $\alpha$ -1,4-糖苷键连接起来的。分支则是由 $\alpha$ -1,6-糖苷键造成的，大约每十个残基中有一个这样的键。

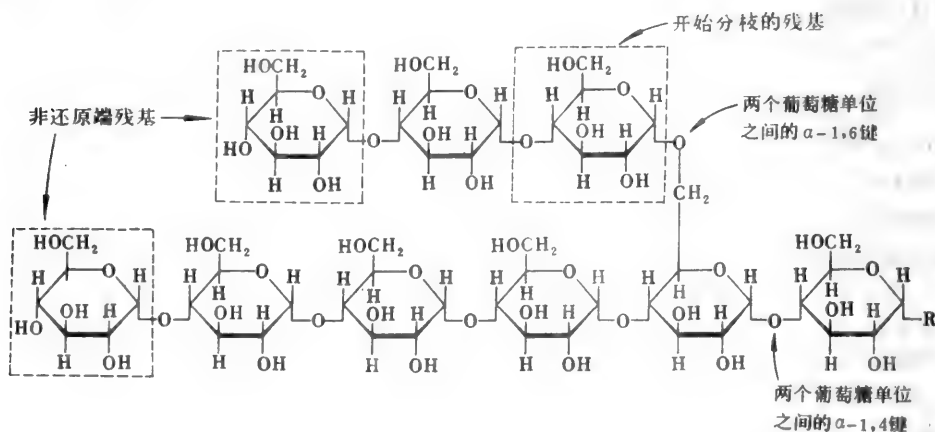


图16-1 糖原颗粒两个外面的分支的结构。糖原分子的其余部分以R表示。

糖原的存在大大增加了在两餐之间和肌肉活动时立即可以利用的葡萄糖的量。一个平均体重为70公斤的男人，体液中葡萄糖的量仅含有40kcal的能量，可是整个躯体中糖原的总量，即使在饿了一夜之后，仍含有600kcal以上的能量。贮藏糖原的两个主要部位是肝脏和骨骼肌。肝脏中糖原的浓度比肌肉中的高，但骨骼肌中贮藏的糖原较多，因为肌肉的量多得多。糖原以直径在100至400Å范围内的颗粒形式存在于细胞溶质中。这个尺寸范围反映了糖原分子并没有



图16-2 糖原分子横切面示意图。

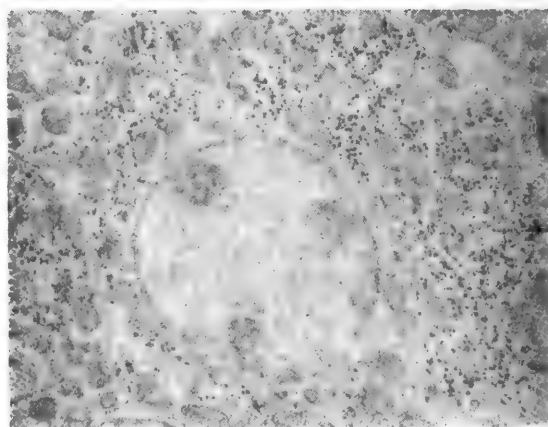


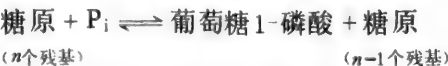
图16-3 肝细胞的电子显微照片。细胞质中浓厚的颗粒就是糖原颗粒。[蒙Dr. George Palade特许。]

一致的大小;典型的分布集中在质量为数百万道尔顿的范围内。在电子显微照片中糖原颗粒呈浓厚状(图16 3)。它们含有催化糖原合成和分解的酶以及一些调节这些过程的酶。不过糖原颗粒与多酶复合物(例如丙酮酸脱氢酶复合物)不同,其不同处在于结合的酶并不以固定的化学计算的关系存在。还有,糖原颗粒中结构的组织程度也没有多酶复合物中的那么高。

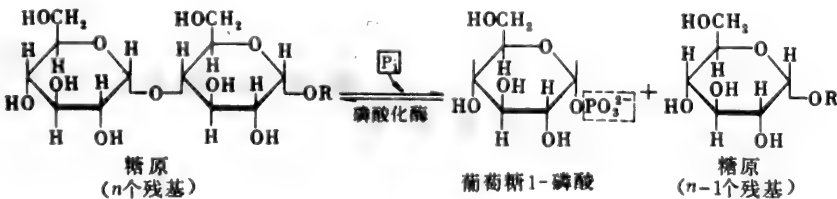
在本章中将比较详细地讨论糖原的合成和降解,其理由如下。第一,这些过程是重要的,因为它们调节着血糖的水平并且为紧张的肌肉活动提供了葡萄糖的储备。第二,糖原的合成和分解是通过不同的反应途径进行的,这一事实说明了生物化学的一个重要的原理。第三,糖原代谢的激素调节是以一种具有一般意义的机理为媒介的。环腺苷酸(cAMP)在糖原的合成和分解的协调性控制中的作用已了解清楚,它也是了解各种各样其它体系中激素作用的源泉。第四,已经鉴定出了许多种遗传性的酶缺陷,其结果是糖原代谢有缺陷。这些糖原贮藏方面的疾病中有一些是在婴儿期就致死的,而其它一些疾病则在临床上关系不大。本章的最后部分讨论常见的双糖即乳糖、麦芽糖和蔗糖的代谢。

### 磷酸化酶催化糖原磷酸解为葡萄糖1-磷酸的作用

糖原分解的途径是由科里, C. (Carl Cori)和科里, G. (Gerty Cori)的深入研究所阐明的。他们证明糖原是由正磷酸裂解\*的,产生一种新的磷酸化的糖,经他们鉴定为葡萄糖1-磷酸。科里们也分离并结晶出了糖原磷酸化酶,此酶催化下列反应:



磷酸化酶催化的是从糖原分子的非还原端顺序地移去一个个葡萄糖残基。正磷酸使末端残基的C-1与相邻残基的C-4之间的键断开。更准确地说,正磷酸分解的是C-1碳原子和糖苷氧原子之间的键,而且C-1上的α构型仍保留不变。



这一反应大概是通过一个正碳离子的中间产物而进行的。C<sub>1</sub>—O键的破裂, C-1上构型的保留和正碳离子中间产物的可能参加都与溶菌酶所催化的几丁质的分解很相似。

在体外,磷酸化酶所催化的反应是极易逆转的。在pH为6.8时,正磷酸根与葡萄糖1-磷酸的平衡比为3.6。这一反应的ΔG°'很小,因为糖苷键为磷酸酯键所取代,而它们的转移潜势是大体相等的。然而在体内,磷酸解作用却沿着糖原分解的方向进行得很远,因为 [P<sub>i</sub>]/[葡萄糖1-磷酸]之比通常大于100。

\* 磷酸解作用——由正磷酸使键裂解(与水解不同,水解是水引起裂解)。

糖原的磷酸解在力学上是有利的，因为所释放出的糖是磷酸化的。反之，水解会产生葡萄糖，而葡萄糖需要消耗一个ATP进行磷酸化后才能进入糖酵解途径。对于肌肉细胞，磷酸解作用还有另一优点，就是葡萄糖1-磷酸不能扩散至细胞外，而葡萄糖则能够扩散出去。即将讨论到肌肉保留着磷酸化糖的重要意义。

糖原的分解还需要脱支酶

磷酸化酶单独地只能将糖原降解至有限的程度。而分支点上的 $\alpha$ -1, 6-糖苷键不能被磷酸化酶所裂解。事实上，当磷酸化酶到达一个距分支点四个残基的末端残基时，它就停止分解 $\alpha$ -1, 4-键。图16-4所示为磷酸化酶作用于糖原颗粒的两个外面的分支的情况。磷酸化酶裂解了一个分支上的五个 $\alpha$ -1, 4-糖苷键和另一分支上的三个这种键。磷酸化酶的分解作用停留在这一阶段，因为末端残基a和d都距分支点h有四个残基。在这一阶段就需要一种新

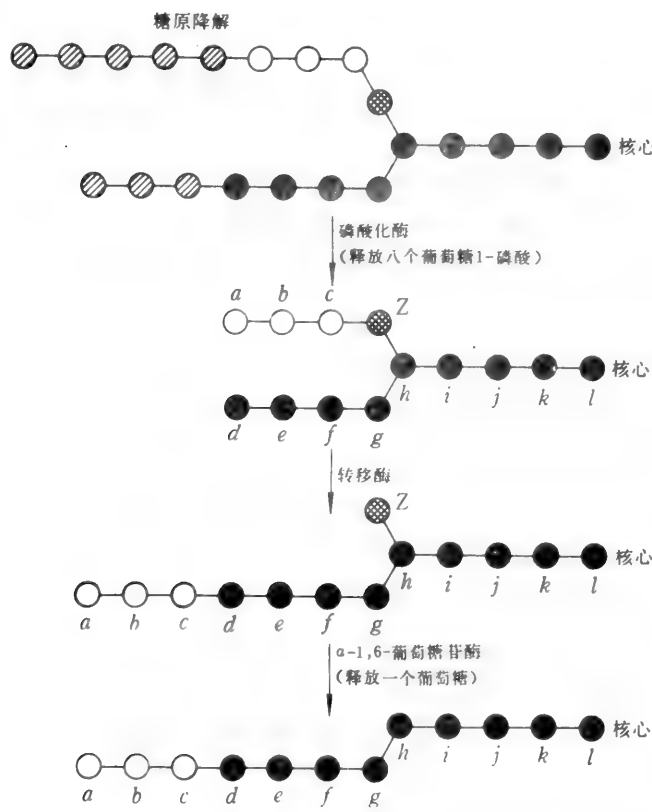
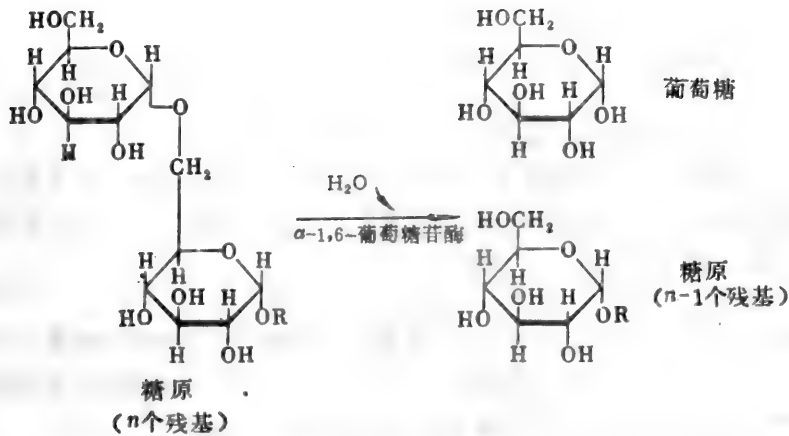


图16-4 糖原降解的步骤。

的酶活性。一种转移酶把三个葡萄糖残基作为一组从一个外面的分支转移到另一个分支上。c和z之间的 $\alpha$ -1, 4-糖苷键破裂，而形成了c和d之间的新的 $\alpha$ -1, 4键。这种转移作用使残基z暴露在第三种分解酶的作用之下，这种酶是 $\alpha$ -1, 6-葡萄糖苷酶，或称脱支酶。这种酶水解残基z和h之间的 $\alpha$ -1, 6糖苷键。

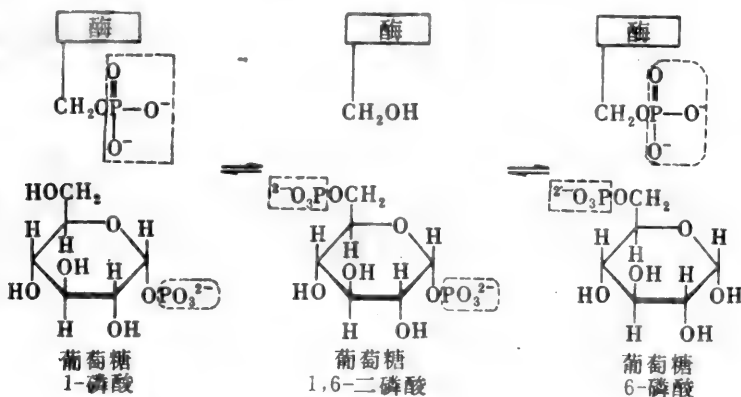




于是，转移酶和脱支酶（ $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷酶）把分支的结构转变为线型的结构，从而为磷酸化酶的进一步作用铺平了道路。 $\alpha$ 的水解使从 $a$ 到 $l$ 的残基都能受到磷酸化酶的作用。值得注意的是一种单个的160kda1的多肽链，它既有转移酶的又有 $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷酶的活性部位。

### 磷酸葡萄糖变位酶把葡萄糖1-磷酸转变为葡萄糖6-磷酸

糖原的磷酸解作用所形成的葡萄糖1-磷酸被磷酸葡萄糖变位酶转变为葡萄糖6-磷酸。平衡混合物含有95%葡萄糖6-磷酸。有活性的酶分子的催化部位含有一个磷酸化的丝氨酸残基。在催化作用中，大概是这个磷酰基转移到了葡萄糖1-磷酸的C-6的羟基上，形成了葡萄糖1,6-二磷酸。然后这一中间产物又将其C-1上的磷酰基转移给酶的活性部位上的丝氨酸残基，结果形成了葡萄糖6-磷酸并且再生出磷酸化的酶。

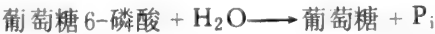


变位酶上的磷酰基会通过水解作用而慢慢丢失。葡萄糖1,6二磷酸的磷酰基可以转移给它而使之得到恢复，葡萄糖1,6二磷酸则是在磷酸葡萄糖激酶所催化的反应中由葡萄糖1-磷酸和ATP形成的。这些反应与糖酵解中的磷酸甘油酸变位酶（203页）的反应类似。2,3-二磷酸甘油酸（2,3 DPG）在2磷酸甘油酸转变为3磷酸甘油酸中的作用和葡萄糖1,6二磷酸

在磷酸葡萄糖的相互转变中的作用类似。还有，磷酸化的酶中间产物也参与这两个反应。

### 肝脏含有葡萄糖6-磷酸酶——肌肉中没有的水解酶

肝脏的一个主要功能就是维持相当稳定的血糖水平。在肌肉活动时和两餐之间肝脏向血液中释放葡萄糖。释放出的葡萄糖主要是被脑和骨骼肌所汲取。磷酸化的葡萄糖与葡萄糖不同，不易扩散到细胞之外。肝脏含有一种水解酶，葡萄糖6-磷酸酶，它能使葡萄糖离开此器官。这种酶是糖原异生（266页）所必须的。

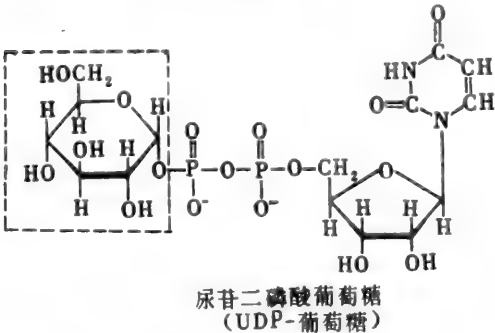


葡萄糖6-磷酸酶也存在于肾脏和肠中，但不存在于肌肉和脑中。当然，葡萄糖6-磷酸保留在肌肉和脑中，这些器官需要大量的这种燃料以产生ATP。反之，葡萄糖并不是肝脏的主要燃料，而肝脏主要为了有利于其它组织而贮藏并释放葡萄糖（424页）。

### 糖原通过不同途径合成和降解

糖原磷酸化酶所催化的反应在体外极易逆转，因为使糖原利用葡萄糖1-磷酸而延长的 $\Delta G^\circ$ 为 $-0.5\text{kcal/mol}$ 。事实上，科里们利用磷酸化酶和一种分支酶是能够以葡萄糖1-磷酸合成糖原的。不过，以后的许多实验观察指明，在体内糖原是通过不同途径合成的。首先，当中性pH下 $[\text{P}_i]/[\text{葡萄糖1-磷酸}]$ 之比为3.6时，磷酸化酶所催化的反应处于平衡，可是细胞中这一比值通常为100以上。因此，在体内磷酸化酶的反应必定朝向糖原降解的方向进行。第二，使磷酸化酶活性增高的激素总是引起糖原的降解。第三，肌肉中完全没有磷酸化酶的病人（麦卡德尔氏病，见285页）能够合成肌肉中的糖原。

1957年李罗尔，L. (Luis Leloir) 及其同事证明糖原通过一种不同的途径被合成。糖基的供体是尿苷二磷酸葡萄糖（UDP-葡萄糖）而不是葡萄糖1-磷酸。合成反应并不是降解反应的逆转：



合成：糖原<sub>n</sub> + UDP-葡萄糖  $\longrightarrow$

糖原<sub>n+1</sub> + UDP

分解：糖原<sub>n+1</sub> + P<sub>i</sub>  $\longrightarrow$

糖原<sub>n</sub> + 葡萄糖1-磷酸

我们现在知道生物体系中生物合成和降解的途径几乎总是不同的。糖原代谢提供了这条重要原理的第一个例子。无论在力能学方面和在控制方面，不同的途径造成了大得多的灵活性。细胞不再受质量作用的支配；

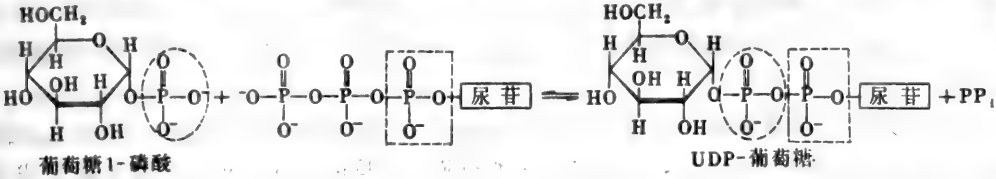
尽管正磷酸对葡萄糖1-磷酸的比值很高，仍能合成糖原。

### UDP-葡萄糖是葡萄糖的一种活化形式

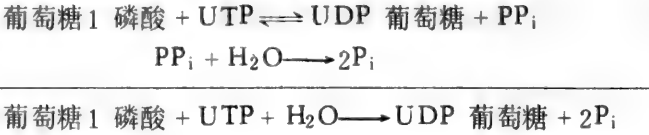
UDP-葡萄糖是糖原生物合成中葡萄糖的供体，它是葡萄糖的活化形式，就像ATP和乙

酰CoA分别是正磷酸和乙酸的活化形式一样。UDP-葡萄糖中糖基的C 1碳原子是活化的,因为它的羟基被UDP的二磷酸部分所酯化。

UDP-葡萄糖是通过UDP-葡萄糖焦磷酸化酶所催化的反应由葡萄糖1-磷酸和尿苷三磷酸(UTP)合成的。这一反应所释放出的焦磷酸根来自UTP外侧的两个磷酸残基。



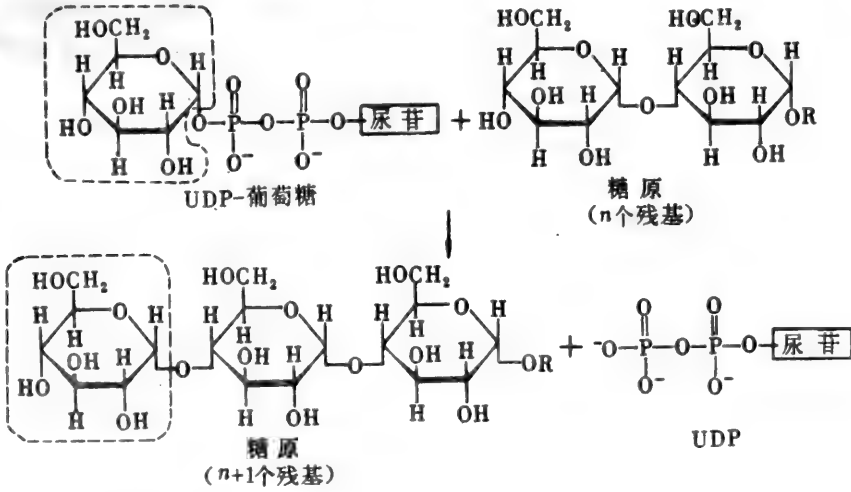
这一反应极易可逆。不过焦磷酸根在体内极易被一种无机焦磷酸酶水解为正磷酸根。实质上不可逆的焦磷酸根的水解推动了UDP-葡萄糖的合成:



UDP-葡萄糖的合成再次说明生物化学中重复出现的下列主题: 许多生物合成反应是由焦磷酸的水解所推动的。这一反应的另一方面具有更广泛的意义,即核苷二磷酸糖是许多双糖和多糖生物合成的糖基供体。

### 糖原合成酶催化葡萄糖从 UDP-葡萄糖转移到生长中的链上

新的糖基单位加到糖原的非还原末端残基上。UDP-葡萄糖的活化的葡萄糖基被转移到糖原末端的C-4的羟基上,形成一个 $\alpha$ -1,4-糖苷键。在这一延伸反应中,正在生长的糖原分子的末端羟基取代了UDP。这一反应是由糖原合成酶所催化的,只有当多糖链已经含有四个以上的残基时这种酶才能把葡萄糖基加上。因此,糖原的合成需要一个引物,它是由不同的合成酶形成的。



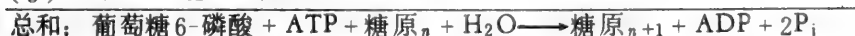
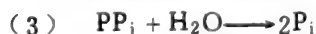
## 分支酶形成 $\alpha$ -1,6键

糖原合成酶仅催化 $\alpha$ -1,4键的合成。还需要另一种酶来形成 $\alpha$ -1,6键,这样才使得糖原成为有分支的高聚物。分支是重要的,因为它增加糖原的溶解度。其次,分支也造成了许多非还原性末端残基,它是糖原磷酸化酶和合成酶的作用部位。因此,分支增加了糖原合成和降解的速率。

分支发生在许多葡萄糖残基被糖原合成酶联成 $\alpha$ -1,4键之后。分支是由一个 $\alpha$ -1,4键的断裂和一个 $\alpha$ -1,6键的形成所造成的,这是一种与脱支不同的反应。连在一起的数个残基,典型的数目是七个,被转移到更里面的部位上去。催化这一反应的分支酶是十分准确的。连在一起的七个左右的残基必须含有非还原性的末端,而且是来自于长度至少为十一个残基的链。此外,新的分支点距离已存在的分支点必须至少有四个残基。

## 糖原是葡萄糖的非常有效的贮藏形式

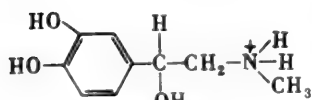
把葡萄糖6-磷酸转变为糖原并且再转变为葡萄糖6-磷酸的代价是什么?除下列的反应5外,有关的反应都已讨论过,反应5是UTP的再生。在核苷二磷酸激酶催化的反应中,UDP被ATP磷酸化。



所以一个葡萄糖6-磷酸掺入糖原消耗一个高能磷酸键。来自糖原降解的能量产量是高度有效的。约有90%的残基是以磷酸解的方式分解为葡萄糖1-磷酸,它不消耗什么就变成了葡萄糖6-磷酸。其余10%是分支的残基,那是以水解的方式被分解的。于是这些葡萄糖分子中的每一个都要用一个ATP来磷酸化成葡萄糖6-磷酸。葡萄糖6-磷酸的完全氧化产生三十七个分子的ATP而每贮藏一个葡萄糖6-磷酸只要消耗一个ATP稍多一点,所以总的贮藏效率约为97%。

## 环AMP是糖原合成和分解的协调控制中心

糖原的合成和分解有不同的途径,这意味着它们必定受到严格的控制。假设这两组过程同时都充分活跃,那么ATP就会被无谓地水解而造成浪费。



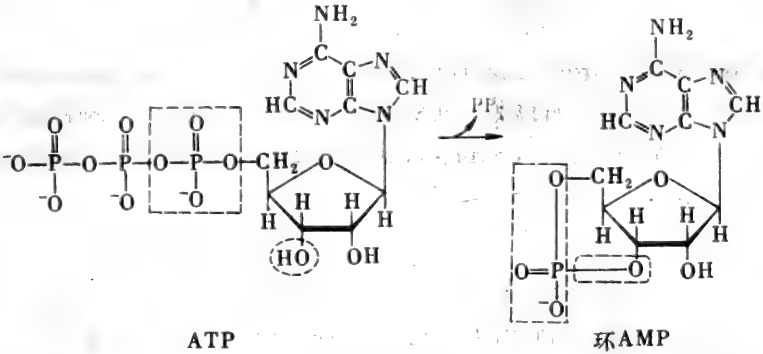
肾上腺素

事实上,糖原的合成和分解是受到协调的控制的,因而当磷酸化酶充分活动时糖原合成酶几乎不起作用,反之亦然。

糖原代谢受到专门激素的深刻影响。胰岛素是一种多肽激素(15页),它增加肝脏合成糖原的能力。胰岛素的作用

机理尚不清楚。血液中胰岛素的水平高是饱食的信号，而水平低则是饥饿的信号（426页）关于肾上腺素和胰高血糖素的作用方式知道得较多，它们的效应和胰岛素的相反。肌肉的活动或其活动的预兆导致肾上腺髓质释放肾上腺素。肾上腺素显著地促进肌肉中糖原的分解，对肝脏中糖原分解影响较小。肝脏对胰高血糖素的反应更强，胰高血糖素也是一种多肽激素，是在血糖水平低时由胰脏的 $\alpha$ 细胞分泌的。这种激素促进肝脏中糖原的分解从而提高血糖的水平。

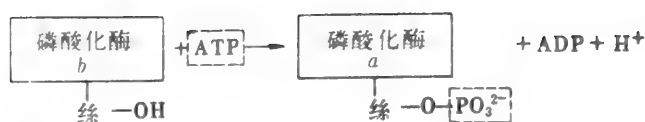
苏塞尔兰德，E. (Earl Sutherland) 发现肾上腺素和胰高血糖素的作用都是通过环AMP而实现的。这一发现导致了下列认识，即环AMP是所有生命形式中普遍存在的，它在控制生物学过程中起着关键的作用（详见第35章）。由ATP合成这一起调节作用的分子是由腺苷酸环化酶所催化的，此酶是与质膜结合的。环AMP的合成是由随后的焦磷酸根的水解所加速的。



肾上腺素和胰高血糖素并不进入它们的靶细胞，而是结合在质膜上并促进腺苷酸环化酶（654页）。细胞内环AMP水平的提高又引起了一系列反应，即活化磷酸化酶并抑制糖原合成酶。我们现在先来讨论控制这些酶的结构基础，然后再讨论那些把环AMP与糖原代谢的关键性酶联系起来的级联反应。

### 磷酸化酶的活化是由于 一个专一的丝氨酸残基被磷酸化

骨骼肌中的磷酸化酶以两种可以相互转变的形式存在：一种有活性的磷酸化酶a和另一种通常无活性的磷酸化酶b（图16-5）。这种酶是一个二聚体，其亚基为92 kdal。磷酸化酶b由于每一个亚基中的一个丝氨酸残基（丝氨酸14）被磷酸化而转变为磷酸化酶a。这一共价修饰是由专门的酶，即磷酸化酶激酶催化的，此激酶是由费希尔，E. (Edmond Fischer) 和克雷布斯，E. (Edwin Krebs) 发现的。磷酸化酶a被一种专门的磷酸酶所钝化，它水解连在丝氨酸14上的磷酸基。



肌肉的磷酸化酶  $b$  只有存在高浓度的 AMP 时才有活性，AMP 以变构方式起作用。AMP 结合在核苷酸结合部位上并改变磷酸化酶  $b$  的构象。ATP 与 AMP 竞争，因此起着负变构效应剂的作用。葡萄糖 6 磷酸也抑制磷酸化酶  $b$ ，大概是和另一个部位结合。在大多数生理条件下，磷酸化酶  $b$  由于 ATP 和葡萄糖 6-磷酸的抑制效应而无活性。反之，不管 AMP，ATP 和葡萄糖

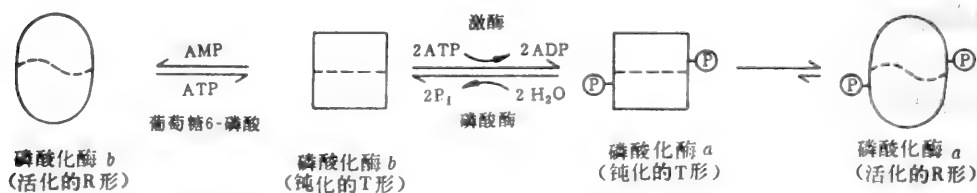


图 16-5 骨骼肌中糖原磷酸化酶的控制示意图。此酶可以采取催化作用钝化的 T (紧张的, tense) 构象或活化的 R (松弛的, relaxed) 构象。磷酸化酶  $a$  的  $R = T$  平衡远远偏于活化的 R 状态一侧。反之，除非 AMP 的水平高而 ATP 和葡萄糖 6 磷酸的水平又低，磷酸化酶  $b$  大多是处于钝化的 T 状态。在大多数生理条件下，活化的酶的比例决定于磷酸化作用和脱磷酸化作用的速率。

糖 6-磷酸的水平如何，磷酸化酶  $a$  是充分活跃的。活化的酶的比例主要决定于磷酸化作用和脱磷酸化作用的速率。在静止的肌肉中，几乎所有的酶都处于钝化的  $b$  形。正如下一节所描述的，肾上腺素水平的提高和肌肉的电刺激引起活化的  $a$  形的形成。

### 糖原磷酸化酶的三维结构

糖原磷酸化酶的  $a$  和  $b$  两种形式的 x-射线结晶学研究是深入了解代谢中这一关键性酶的催化机理和控制机理的源泉。单体亚基的 841 个氨基酸残基紧密折叠成三个结构域(图 16-6)：一个氨基末端结构域 (310 个残基)，一个糖原结合结构域 (160 个残基) 和一个羧基末端结构域 (371 个残基)。催化部位存在于一个深的裂缝中，裂缝是由这三个结构域中每一个的残基形成的。可以预期，对于活性部位的这种屏蔽是使之与水的环境隔开从而有利于磷酸解作用而不利于水解作用。吡哆醛磷酸(维生素  $B_6$ )是酶活性所必需的，它结合在靠近葡萄糖 1-磷酸的部位处。这一辅助因子的醛基与酶的羧基末端结构域中的赖氨酸侧链形成希夫碱的键。用氢化硼还原希夫碱后酶活性仍保留着，这证明醛基并不参与催化作用，是与其它含有吡哆醛的酶不同的。可是，吡哆醛磷酸的磷酸基似乎直接参与催化作用。磷酸化酶还有一个糖原结合部位，它与催化部位不同。这一部位距离催化部位约 30 Å，其作用是使酶与糖原颗粒连接。这一连接部位与催化部位之间距离这么大使得酶能够磷酸化许多末端残基而不必在每一轮催化作用之后进行解离和再结合。

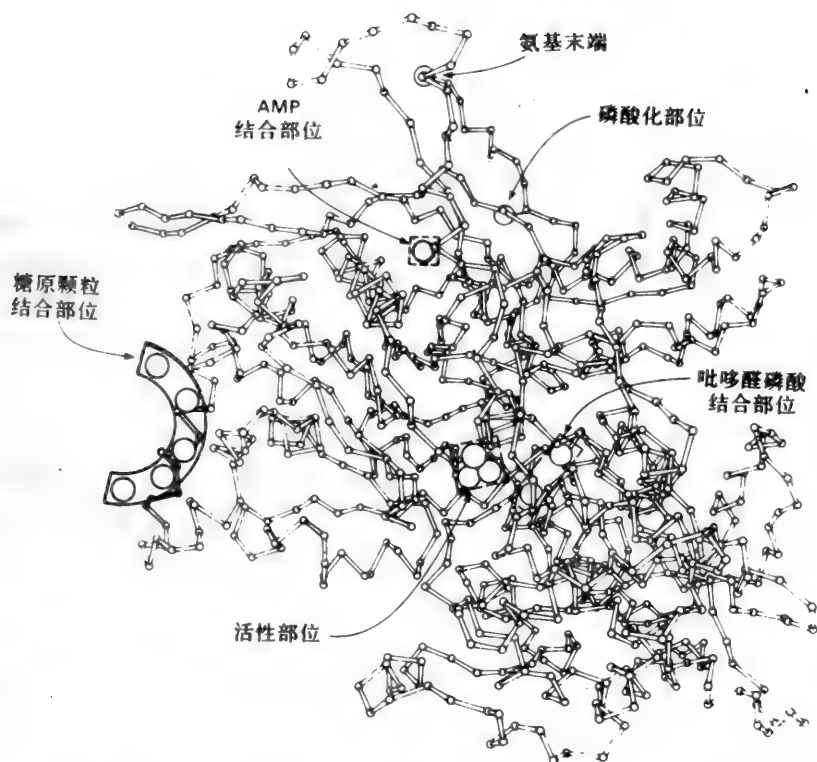


图16-6 磷酸化酶 *a* 的  $\alpha$  亚单位示意图，示出催化部位、与糖原颗粒结合部位、变构部位和磷酸化部位的存在。〔蒙 Dr. Robert Fletterick, Dr. Neil Madsen, and Dr. Peter Kasvinsky 特许。〕

此外，磷酸化酶还有至少两个变构的控制部位。葡萄糖和核苷是肝脏的磷酸化酶 *a* 的变构抑制剂（284 页），它们在靠近催化部位处结合。AMP 是磷酸化酶 *b* 的变构活化剂，它结合在一个靠近两个亚基的界面的部位上，此部位距催化部位和糖原结合部位都很远。丝氨酸 14 是磷酸化酶 *b* 转变为 *a* 的磷酸化部位，它的位置也靠近亚基的界面。在磷酸化酶 *a* 中，这一磷酸基通过氢键与精氨酸 69 的侧链相结合。与此相反，含有磷酸化酶 *b* 的起自氨基末端的 19 个残基的区域并没有确定的结构。在 *b* 形式中这一区域的灵活性令人想起胰蛋白酶原的非常疏松的活化结构域，当转变为胰蛋白酶时这一部分就采取确定的构象（131 页）。由磷酸化和由变构效应剂所引起的结构变化的详细研究仍在进行中。已经很清楚，糖原磷酸化酶高度精巧地综合了关于细胞能量代谢的知识。

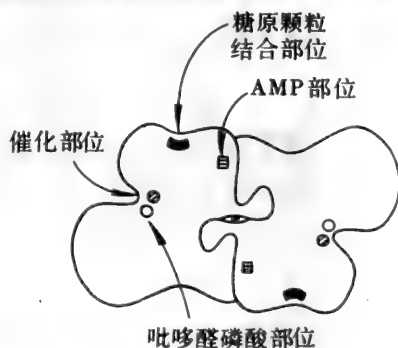
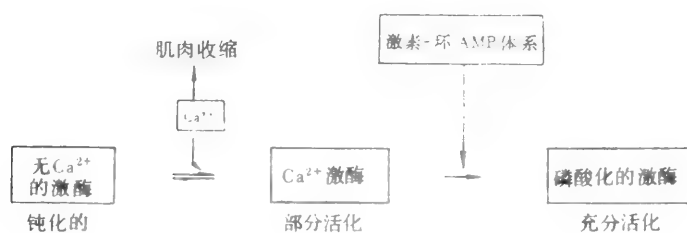


图16-7 磷酸化酶 *b* 二聚体示意图，是沿着分子的二重轴向下看的，示出各个结构域，以及葡萄糖 1 磷酸和麦芽三糖的结合部位。〔依据 I. T. Weber, L. N. Johnson, K. S. Wilson, D. G. R. Yeates, D. L. Wild, and J. A. Jenkins, *Nature* 274 (1978): 433.〕

## 磷酸化酶激酶也被磷酸化作用所活化

磷酸化酶激酶的活性也是由共价修饰调节的。磷酸化酶激酶也像磷酸化酶一样，是由磷酸化作用而从活性低的形式转变为活性高的形式。催化这一活化作用的酶是激素-环AMP体系的一个组分，这很快就要讨论到。磷酸化酶激酶还可能以另一种不同的方式被  $10^{-7} \text{ mol/L}$  左右的  $\text{Ca}^{2+}$  部分地活化。此激酶的这种活化方式在生物学上是重要的，因为肌肉收缩是由  $\text{Ca}^{2+}$  的释放引发的（第31章）。因此，糖原的分解和肌肉的收缩通过细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  水平的瞬时增高而联系起来了。



## 糖原合成酶由于一特殊的丝氨酸

酸残基被磷酸化而失活

糖原的合成与其降解是密切协调的。糖原合成酶的活性也像磷酸化酶的活性一样，是由

共价修饰所调节的。磷酸化作用把糖原合成酶 *a* 转变为通常无活性的 *b* 形式。磷酸化的 *b* 形式（以前称为 *D* 或依赖性形式）的活性需要高水平的葡萄糖6-磷酸，而脱磷酸化的 *a* 形式（以前称为 *I* 或独立性形式）的活性则与葡萄糖6-磷酸的存在与否无关。因此，磷酸化作用对于糖原合成酶和磷酸化酶的活性有相反的效应。



图16-8 电子显微照片，示出心肌中糖原颗粒的定位。〔蒙Dr. Don W. Fawcett特许。〕



## 一套级联反应控制着糖原 合成酶和磷酸化酶的磷酸化作用

我们现在来讨论影响着糖原代谢的激素和决定着糖原合成酶和磷酸化酶活性的磷酸化作用之间的联系。这一系列反应（图16-9）为：

1. 肾上腺素结合在肌肉细胞的质膜上并活化腺苷酸环化酶。
2. 质膜中的腺苷酸环化酶催化ATP形成环AMP的作用。
3. 细胞中已增高的环AMP水平活化一种蛋白质激酶，在没有环AMP时这种激酶是钝化的。环AMP的结合引起变构而活化蛋白质激酶（见第35章）。
4. 依赖于环AMP的蛋白质激酶既将磷酸化酶激酶磷酸化，也将糖原合成酶磷酸化。这两种酶的磷酸化就是糖原合成和分解受到协调性的调节的基础。由这种依赖于环AMP激酶所引起的磷酸化使磷酸化酶发生作用（通过磷酸化酶激酶），同时又使糖原合成酶不起作用（直接地）。

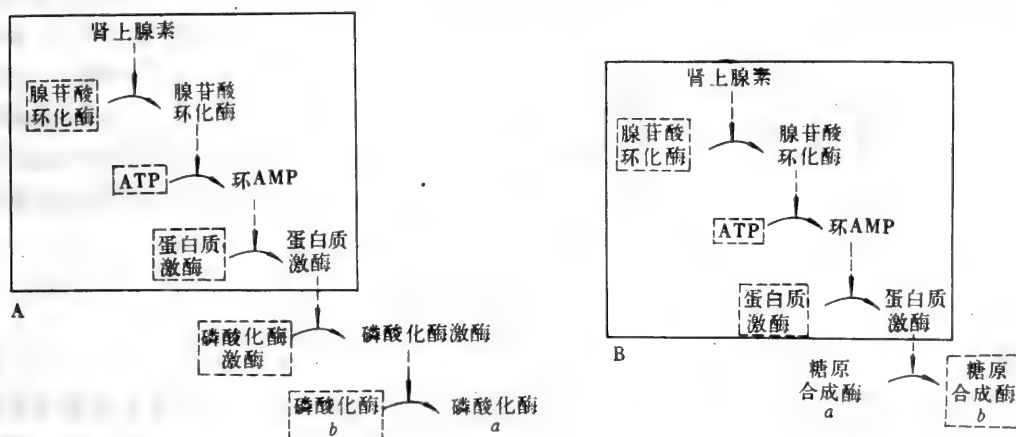
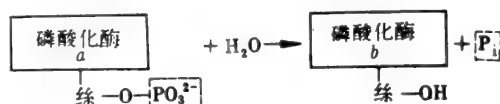


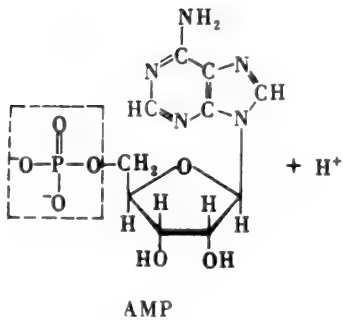
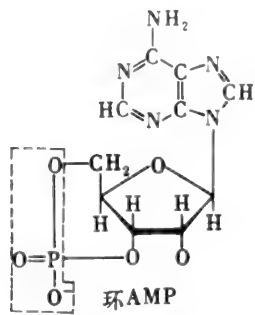
图16-9 控制糖原代谢的级联反应：(A)糖原降解；(B)糖原合成。导致蛋白质激酶活化的反应序列和调节糖原降解和合成的反应序列相同。加虚线框者为非活化形式，余为活化形式。

### 磷酸酶使激酶的调节效应逆转

因磷酸化作用而产生的酶活性的变化可借水解作用除去磷酰基而逆转。例如，磷酸化酶 *a* 到 *b* 的转变就被磷酸化酶磷酸酶催化：



此酶也水解磷酸化酶激酶的活化形式上的磷酸基而使此激酶钝化。还有，同一磷酸酶也除去



糖原合成酶 *b* 上的磷酸基而使之变为活性强得多的 *a* 形式。这又是另一种分子装置，可以对糖原的合成和分解进行协调。磷酸酶的活性似乎也是受到调节的。例如， $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg ATP}$  合在一起抑制磷酸化酶磷酸酶，而活化磷酸化酶激酶。肌肉的糖原合成酶磷酸酶为糖原所抑制。这样，在糖原水平高时，肌肉的糖原合成酶就停留在磷酸化的 *b* 形式。

来自环 AMP 的信号也能被取消。环 AMP 中的磷酸二酯键可由一种专一的磷酸二酯酶水解，形成 AMP，AMP 不能活化蛋白质激酶。这一高度放能反应的  $\Delta G^{\circ'}$  为  $-11.9 \text{ kcal/mol}$ 。

### 一系列级联反应放大了激素的信号

控制糖原代谢的酶促级联反应和血液凝固中蛋白水解酶的级联反应（132 页）类似。在这两个过程中，级联的酶促反应提供了一种高度的放大。在糖原分解中，有三个由酶催化的控制阶段；而在糖原合成中，有两个控制阶段。假若糖原磷酸化酶和合成酶是直接由肾上腺素的结合来调节的话，那么就需要千倍以上的肾上腺素来引起存在这种放大的级联反应时的糖原分解。

### 肝脏中的糖原代谢调节血糖水平

肝脏中糖原的合成和分解的控制是调节血糖水平的中心。血液中葡萄糖的浓度通常在每 100 毫升 80 至 120 毫克的范围内。肝脏能感知血液中葡萄糖的浓度，如果其水平在一阈值以上，肝脏就汲取葡萄糖；在此值以下，肝脏就释放葡萄糖。当灌注葡萄糖时，肝脏中磷酸化酶 *a* 的量迅速降低（图 16-10）。经过一段滞豫期后，糖原合成酶 *a* 的量增多，其结果是糖原的合成。近年的研究表明磷酸化酶 *a* 是肝细胞中葡萄糖的感受器。葡萄糖与磷酸化酶 *a* 结合使变构平衡从 R 状态偏移到 T 状态（见图 16-5），这就把丝氨酸 14 上的磷酸基暴露给磷酸酶而使之水解。重要的是磷酸酶与磷酸化酶 *a* 紧密结合，而只有当葡萄糖将后者诱导为 T 状态时，磷酸酶才起催化作用。

葡萄糖怎样活化合成酶呢？回想一下，同样的磷酸酶作用于磷酸化酶和糖原合成酶。磷酸化酶 *b* 与 *a* 形式不同，它不与磷酸酶结合。于是，磷酸化酶 *a* 转变为 *b* 的同时，磷酸酶就释放出来了，它是游离的，可以去活化糖原合成酶。把

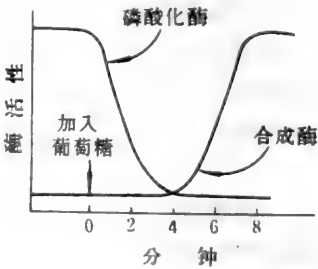


图 16-10 灌注葡萄糖引起磷酸化酶的钝化，随后糖原合成酶活化。[依据 W. Stalmans, H. De Wulf, L. Hue, and H. G. Hers, *Eur. J. Biochem.* 41 (1974): 127.]

钝化的合成酶 *b* 上的磷酰基除去就使它转变为活化的 *a* 形式。起初，每有一个磷酸酶分子，约有十个磷酸化酶 *a* 分子。因此，只有当大部分磷酸化酶 *a* 转变为 *b* 形式时，合成酶的活性才开始增高（图16-10）。这种卓越的感知葡萄糖的体系依赖于三种关键性的因素：（1）结合葡萄糖的变构部位和丝氨酸磷酸之间的通讯；（2）利用同一种磷酸酶去钝化磷酸化酶和活化合成酶；（3）磷酸酶与磷酸化酶 *a* 结合以防止合成酶过早活化。

已知多种由遗传决定的糖原贮藏疾病

1929年冯·基尔科（Edgar von Gierke）首次描述了一种糖原贮藏的疾病。这种病的患者因为肝脏过分膨大而腹部特别大，在两次进餐之间低血糖特别显著。而且，注入肾上腺素或胰高血糖素后血糖并不上升。患有这种糖原贮藏疾病的婴儿，由于血糖水平低，可能有痉挛。

科里们于1952年阐明了冯·基尔科氏病在酶方面的缺陷。他们发现这种疾病患者的肝脏中没有葡萄糖6-磷酸酶。这是首次示证肝脏中的一种酶因遗传而缺乏。肝中的糖原在结构上是正常的，但是存在的量异常地多。肝脏中葡萄糖6-磷酸酶的缺乏引起低血糖，因为不能由葡萄糖6-磷酸形成葡萄糖。这种磷酸化的糖不能离开肝脏，因为它不能穿透过质膜。肝脏中的糖酵解发生补偿性的增高，使得血液中乳酸和丙酮酸水平提高。患有冯·基尔科氏病的人对脂肪代谢的依赖性也增高。

已鉴定出许多种糖原贮藏的疾病（表16-1）。科里们还阐明了另一种糖原贮藏疾病（类型Ⅲ）的生物化学上的缺陷，仅用体格检查的方法不能把这种病与冯·基尔科氏病（类型Ⅰ）区别开来。患类型Ⅲ的疾病时，肝脏和肌肉中糖原的结构异常，量也显著增多。最为突出的是，糖原外面的分支特别短。这种类型疾病的患者没有脱支酶（ $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷酶），因此只有糖原最外面的分支能被有效地利用。这样，这种异常的糖原只有一小部分能作为可以利用的葡萄糖的贮藏形式而起作用。

在麦克阿德尔（McArdle）氏病（类型Ⅴ）中发现了一种限于肌肉中的糖原代谢的缺陷。肌肉中没有磷酸化酶的活性，病人进行紧张运动的能力是有限的，因为肌肉发生痛性痉挛。除此之外，病人是正常的并且发育良好。由此可见，有效地利用肌肉中的糖原并不是生命所必需的。

表 16-1 糖 原 贮 藏 疾 病

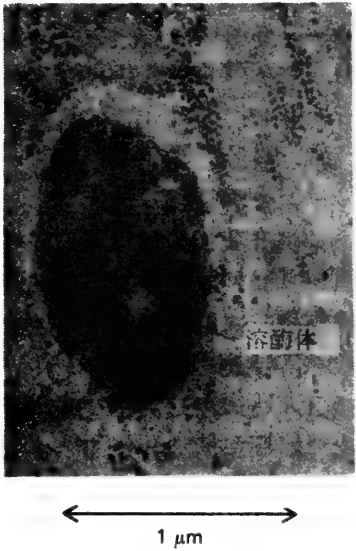


图16-11 患有类型Ⅱ糖原贮藏疾病〔庞波（Pompe）氏病〕的婴儿骨骼肌的电子显微照片。由于缺乏 $\alpha$  1,4-葡萄糖苷酶，溶酶体中充满了糖原。糖原降解的这种缺陷仅限于溶酶体中。细胞溶质中糖原的量是正常的。  
〔引自H.G.Hers and F.Van Hoof (eds.), *Lysosomes and Storage Diseases*, Academic Press, 1973), p.205.〕

类 型	缺 乏 的 酶	受影响的器官	受影响器官中的糖原	临 床 症 状
Ⅰ 冯·基尔科氏病	葡萄糖6-磷酸酶	肝和肾	量增多； 结构正常。	肝特别增大。不能茁壮成长。严重的低血糖症， 酮病，高尿酸血，高酯血。
Ⅱ 庞波氏病	$\alpha$ 1,4-葡萄糖苷酶 (溶酶体中的)	所有的器官	量大增； 结构正常	通常在2周岁前因心脏、呼吸异常而致死。

类 型	缺 乏 的 酶	受影响的器官	受影响器官中的糖原	临 床 症 状
Ⅲ 科里氏病	淀粉 1,6 葡萄糖 苷酶(脱支酶)	肌肉和肝	量增多; 外面的分支短。	和类型 I 类似, 但较轻。
Ⅰ 安德森氏 (Andersen's)病	分支酶 ( $\alpha$ 1,4 $\rightarrow$ $\alpha$ 1,6)	肝和脾	量正常; 外面的 分支特长。	肝逐渐硬化。通常在 2 周岁前因肝功能丧失致死。
Ⅴ 麦克阿德尔氏病	磷酸化酶	肌肉	量略增; 结构正常。	由于肌肉的痛性痉挛进行紧张锻炼的能力有限。 除此之外, 患者正常并且发育良好。
Ⅵ 赫尔氏(Her's)病	磷酸化酶	肝	量增多。	类似类型 I, 但较轻。
Ⅶ	磷酸果糖激酶	肌肉	量增多; 结构正常。	类似类型 I。
Ⅷ	磷酸化酶激酶	肝	量增多; 结构正常。	肝略增大; 轻度低血糖症。

注: 从类型 I 到类型 VII 以常染色体隐性方式遗传。类型 VIII 为性联遗传。

### 淀粉是植物的贮藏多糖

现在我们来讨论其它一些常见的多糖。植物体内养分的库存是淀粉, 淀粉有两种形式。直链淀粉, 即不分支类型的淀粉, 是由  $\alpha$ -1,4-联结的葡萄糖残基组成的。支链淀粉, 即分支的类型, 大约每有三十个  $\alpha$ -1,4-键就有一个  $\alpha$ -1,6-键, 所以它类似糖原, 不过分支程度较低。

人所摄取的糖中一半以上是淀粉。支链淀粉和直链淀粉都能迅速被  $\alpha$ -淀粉酶水解, 它是由唾液腺和胰脏分泌的。 $\alpha$ -淀粉酶水解内部的  $\alpha$ -1,4-键产生麦芽糖、麦芽三糖和  $\alpha$ -糊精。麦芽糖是由两个  $\alpha$ -1,4-相连的葡萄糖残基组成的 (图 16-12), 麦芽三糖是由三个这样的残基组成的。 $\alpha$ -糊精是由数个葡萄糖单位组成的, 这些单位除以  $\alpha$ -1,4-相连外, 还以  $\alpha$ -1,6-相连。麦芽糖酶将麦芽糖和麦芽三糖水解为葡萄糖, 而  $\alpha$ -糊精酶则将  $\alpha$ -糊精水解为葡萄糖。麦芽中还有另外一种淀粉酶, 称为  $\beta$ -淀粉酶, 它将淀粉水解为麦芽糖。 $\beta$ -淀粉酶仅作用于非还原性末端的残基。

另一种主要的植物多糖是纤维素, 它起着结构的而不是营养的作用。事实上, 纤维素是生物圈中最丰富的有机化合物, 它占所有的有机碳的一半以上。纤维素是葡萄糖残基以  $\beta$ -1,4-键相联而成的不分支的高聚物。哺乳动物没有纤维素酶因而不能消化木头和植物的纤维。不过某些反刍动物在其消化道中聚藏着产生纤维素酶的细菌, 所以能消化纤维素。

葡聚糖是另一种仅由葡萄糖残基主要以  $\alpha$ -1,6-键组成的多糖。偶尔会形成  $\alpha$ -1,2; $\alpha$ -1,3 或  $\alpha$ -1,4 键而出现分支, 视物种而定。葡聚糖是酵母和细菌的贮藏多糖。昆虫和甲壳类的外骨骼含有几丁质, 那是由  $\beta$ -1,4-相连的 N-乙酰葡萄糖胺组成的。因此, 几丁质类似纤维素, 不过 C-2 上的取代基不是羟基而是乙酰化的氨基。

### 麦芽糖、蔗糖和乳糖是常见的双糖

三种常见双糖的结构如图 16-12 所示。如前所述, 麦芽糖来自于淀粉的水解, 然后又被麦芽糖酶水解为葡萄糖。蔗糖即普通的食糖, 商业上是从甘蔗或甜菜获得的。蔗糖中葡萄糖

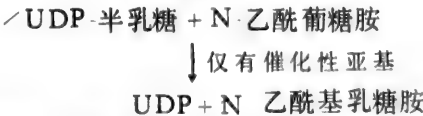
残基和果糖残基的异头碳原子以 $\alpha$ 糖苷键相连。因此，蔗糖没有还原性的末端基团，与大多数其它的糖不同。蔗糖酶催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖的反应。乳糖是乳中的双糖，在任何

其它地方都不能找到大量的乳糖。乳糖酶催化乳糖水解为半乳糖和葡萄糖。乳糖酶、蔗糖酶、麦芽糖酶和 $\alpha$ -糊精酶都结合在小肠内壁上的粘膜细胞中。

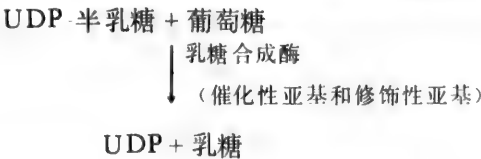
UDP 糖类是合成蔗糖和乳糖的活化的中间产物，正如UDP 葡萄糖是合成糖原的葡萄糖基供体一样。事实上，核苷二磷酸糖是合成几乎所有糖苷键的活化的中间产物。例如，纤维素可由腺苷二磷酸葡萄糖（ADP-葡萄糖）、胞苷二磷酸葡萄糖（CDP-葡萄糖）或鸟苷二磷酸葡萄糖（GDP-葡萄糖）合成，视植物种类而定。蔗糖的合成是葡萄糖从UDP-葡萄糖上转移到果糖6 磷酸上以形成蔗糖6 磷酸，后者再水解成蔗糖。

乳糖的合成由一种修饰性亚基控制

乳糖合成的控制是特别有趣的。乳糖合成酶是由一催化性亚基和一修饰性亚基组成的。分离出来的催化性亚基称为半乳糖基转移酶，其催化活性是把半乳糖从UDP-半乳糖上转移到N 乙酰葡萄糖胺上，形成N 乙酰基乳糖胺。



与修饰性亚基 $\alpha$ -乳清蛋白结合后，催化性亚基的专一性就改变了。所形成的复合物称为乳糖合成酶，它不是把半乳糖转移给N 乙酰葡萄糖胺而是转移给葡萄糖，于是形成乳糖。



半乳糖基转移酶存在于大多数组织中，并在其中参与糖蛋白中糖部分的合成。与此相反，乳糖合成酶仅存在于乳腺中。在怀孕期，乳腺中合成并贮存半乳糖基转移酶，但几乎没有修饰性亚基。分娩时，某些激素水平的突然提高引起大量修饰性亚基的合成。于是所产生的乳糖合成酶复合物形成大量乳糖。乳糖合成的控制说明激素可能通过变换酶的专一性而发生其生理效应。

大多数成年人不能忍受奶，因为他们缺乏乳糖酶

几乎所有的婴儿和儿童都能消化乳糖。反之，在某些区域的居民中，有许多成年人缺乏

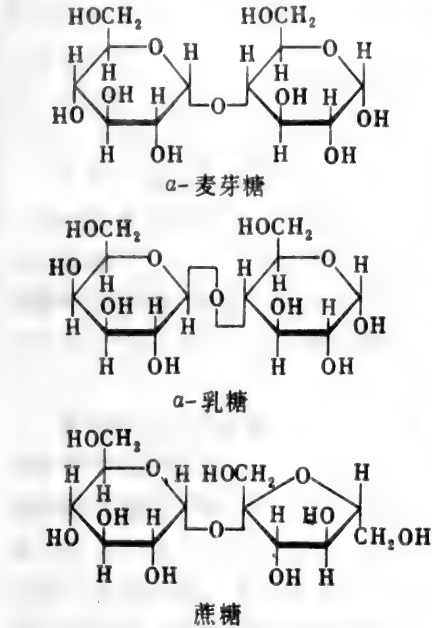


图16-12 常见的双糖： $\alpha$ -麦芽糖、 $\alpha$ -乳糖和蔗糖的结构。前缀 $\alpha$ 表示双糖还原端的异头碳原子的构型，而不是表示糖苷键的构型。

乳糖酶，这就使得他们不能忍受奶。在缺乏乳糖酶的成年人中，在摄取奶后乳糖积累在小肠腔中，因为小肠没有办法吸收这种双糖。这些未被吸收的乳糖发生很大的渗透效应，于是液体流入小肠中。因此，不能忍受乳糖的临床症状就是腹胀、恶心、痉挛、疼痛和腹泻。乳糖酶的缺乏似乎是通过一种常染色体隐性的途径遗传的，通常在青春期或青年时期表现出来。在人的群体中乳糖酶缺乏的普遍性变化很大。例如，丹麦人中有3%缺乏乳糖酶而泰国人中却有97%。在成年期不食用奶的人的群体中，通常缺乏乳糖酶的趋势较大，在其它哺乳动物中也是如此。人类在成年时仍能消化乳糖的能力似乎是在大约万年以前饲养牛时期出现的。

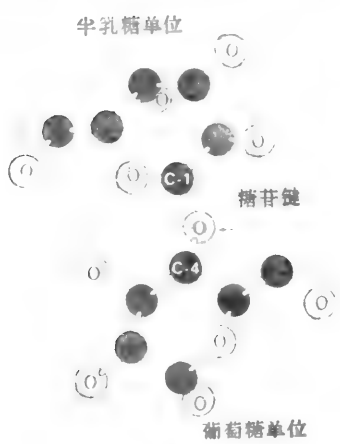


图16-13 乳糖的模型。

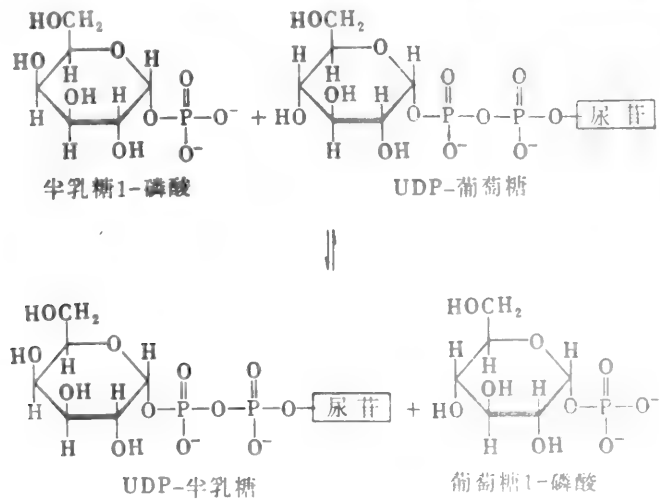
### 果糖和半乳糖进入糖酵解的入口处；

果糖占有饮食中很重要的一部分碳水化合物。典型的每天的摄取量为100克，既有游离的糖也有来自蔗糖的。被摄取的果糖大部分是由肝脏利用果糖1-磷酸途径而代谢的。这一途径中的第一步是果糖激酶使果糖磷酸化为果糖1-磷酸。然后果糖1-磷酸分解为甘油醛和二羟丙酮磷酸。这种醛醇裂解是由一种专门的果糖1-磷酸醛缩酶所催化的。然后甘油醛被丙糖激酶磷酸化为甘油醛3-磷酸，所以它也能进入糖酵解。另一种途径是乙糖激酶将果糖磷酸化为果糖6-磷酸。不过，己糖激酶对葡萄糖的亲和力比它对果糖的要大二十倍。在肝脏中，葡萄糖的水平高，因此很少有果糖被磷酸化为果糖6-磷酸。然而，在脂肪组织中，果糖的水平比葡萄糖的高得多，因此果糖6-磷酸的形成所受到的竞争性抑制的程度不大。所以脂肪组织中的大部分果糖是通过果糖6-磷酸而被代谢的。

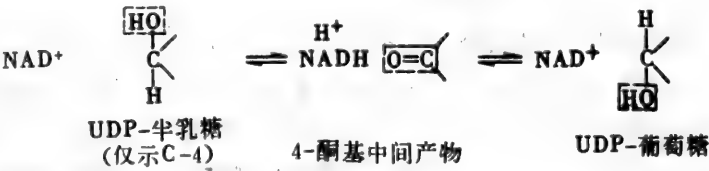
半乳糖来自乳糖的水解，乳糖是奶中主要的糖。然后半乳糖经过四个步骤转变为葡萄糖1-磷酸。半乳糖-葡萄糖相互转变途径中的第一个反应是半乳糖激酶使半乳糖磷酸化为半乳糖1-磷酸。



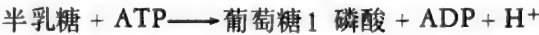
然后通过一交换反应形成UDP-半乳糖，这个反应是由半乳糖1-磷酸尿苷酰转移酶催化的。



当半乳糖还连在UDP上时，它差向异构化为葡萄糖。C-4上的羟基的构型被 **UDP-半乳糖-4-差向异构酶** 转过来，此酶含有一紧密结合的  $\text{NAD}^+$ 。荧光的研究已证明在催化过程中此  $\text{NAD}^+$  瞬时还原为  $\text{NADH}$ 。  $\text{NAD}^+$  大概接受了连在糖的C-4上的氢原子，并形成了一个4-



酮糖中间产物。然后  $\text{NADH}$  将它的氢转移给C-4的另一侧以形成另一种差向异构体。由半乳糖激酶、转移酶和差向异构酶所催化的各反应的总和为：

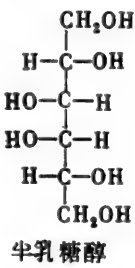


差向异构酶所催化的可逆反应之所以重要，不仅是为了利用半乳糖作为燃料分子。假若饮食中半乳糖的量不能充分满足合成复杂的多糖和糖蛋白中半乳糖残基的需要，那么 **UDP-葡萄糖转变为UDP-半乳糖** 就是必要的。

假若没有转移酶，半乳糖的毒性就非常高

半乳糖1-磷酸尿苷酰转移酶的缺乏引起半乳糖血症，这是一种以常染色体隐性方式遗传的严重疾病。这种病的患者体内半乳糖的代谢阻断在半乳糖1-磷酸。受折磨的婴儿不能成长。吃奶后发生呕吐或恶心，肝大和黄疸也常发生。其次，许多半乳糖血症的患者在智力上也发育迟滞。血中半乳糖水平特别高，尿中也有半乳糖。此外，红细胞中半乳糖1 磷酸的浓度也增高。红血细胞中此转移酶的缺乏是肯定性的诊断指标。

半乳糖血症的疗法就是排除饮食中的半乳糖。没有半乳糖的饮食会使所有的临床病症显著地减退，但智力上的迟滞除外，这是不可逆的。某些病人继续不断地摄取半乳糖可能招致死亡。半乳糖血症的危害是由一种毒性物质的积累引起的，而不是由于一种必要化合物的缺乏。病人能够从UDP 葡萄糖合成UDP-半乳糖，因为他们的差向异构酶活性是正常的。毒性物质之一是半乳糖醇，这是由半乳糖的还原形成的。高水平的半乳糖醇会使眼球晶体中形成白内障。半乳糖1-磷酸可能是某些其它有毒物质的前体，或者它本身在高水平下就是有毒的。



### 概 要

糖原是易被动员的燃料贮存库，是葡萄糖残基的有分支的高聚物。糖原中大多数葡萄糖单位都是由  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接起来的。大约每到第十个残基上就有一个由  $\alpha$ -1,6-糖苷键造成的分支。糖原大量存在于肌肉和肝脏中，以水化的颗粒形式贮存在它们的细胞质中。大多数糖原分子都是由磷酸化酶的作用而降解为葡萄糖1-磷酸。末端残基的C-1和相邻残基的C-4之间的糖苷键被正磷酸分解，产生葡萄糖1-磷酸，它又能可逆地转化为葡萄糖6-磷酸。分支

点则被两种其它酶的协同作用所降解,这两种酶是一种转移酶和一种 $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷酶。后一种酶(也称为脱支酶)催化 $\alpha$ -1,6键的水解,产生游离的葡萄糖。糖原是通过一种不同的途径合成的。糖原合成中活化的中间产物UDP-葡萄糖是由葡萄糖1-磷酸和UTP形成的。糖原合成酶催化葡萄糖的转移,即从UDP-葡萄糖上转移到生长中的糖原分子中末端残基的C-4羟基上。分支酶把一些 $\alpha$ -1,4联结转变成 $\alpha$ -1,6联结。

糖原的合成和降解是由一套起放大作用的级联反应进行着协调的控制的。当磷酸化酶有活性时糖原合成酶失活,反之亦然。肾上腺素和胰高血糖素促进糖原的分解而抑制其合成,因为它们提高细胞内环AMP的水平,而环AMP又活化一种蛋白质激酶。于是糖原合成酶被磷酸化,这使它失活。磷酸化酶也被磷酸化,但此时这种酶变为活性更高的形式。这两种酶的磷酸基能被同一种磷酸酶去除。糖原合成酶和磷酸化酶也受到非共价的变构相互作用所调节。实际上,磷酸化酶是肝细胞中葡萄糖-感知体系中的关键部分。

植物体内养分的贮库是淀粉,它像糖原,不过分支较少。淀粉被水解为麦芽糖,这是由两个葡萄糖残基以 $\alpha$ -1,4-相连组成的。麦芽糖又被水解成葡萄糖。其它常见的双糖为蔗糖和乳糖,蔗糖水解为葡萄糖和果糖,乳糖水解为半乳糖和葡萄糖。当联接在UDP上时,半乳糖和葡萄糖可以互变。UDP-半乳糖是乳糖合成中活化的中间产物。

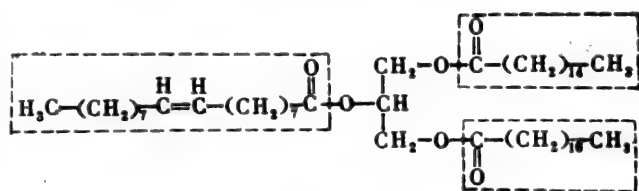
## 习 题

1. 写出由半乳糖形成糖原的平衡方程式。
2. 写出肝脏中由果糖形成葡萄糖的平衡方程式。
3. 从肝病患者得到的糖原样品与正磷酸盐、磷酸化酶、转移酶和脱支酶共同保温。在这一混合物中所形成的葡萄糖1-磷酸与葡萄糖之比为100。这一患者最可能缺乏的是什么酶?
4. 试对下列事实提出一项解释:类型I糖原贮藏疾病(冯·基尔科氏病)的糖原量增多。
5. 在葡萄糖存在下生长的磷酸化酶 $\alpha$ 的晶体,在加入例如葡萄糖1-磷酸这样的底物时就会破碎。为什么?
6. 肌肉的磷酸化酶激酶是很大的酶(1,300kdal),其亚基结构为 $A_4B_4C_8$ 。此酶的B亚基被环AMP-依赖激酶很快磷酸化,其结果是酶的活化。然后此酶的A亚基慢慢被磷酸化,这就使得A和B两种亚基都对专一的磷酸酶的作用敏感。A亚基的缓慢磷酸化可能有什么功能上的意义?



## 第17章 脂 肪 酸 代 谢

我们现在从碳水化合物代谢转到脂肪酸代谢,脂肪酸是一类含有长的烃链和一个末端羧基的化合物。脂肪酸有两个主要的生理功能。第一,它们是磷脂和糖脂的构造单元。这些亲水又亲脂的分子是生物膜的主要组分,如第10章中所讨论的。第二,脂肪酸是燃料分子。它们以三酰



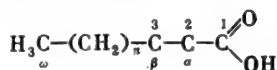
三酰基甘油

基甘油的形式被贮藏,三酰基甘油是甘油的不带电荷的酯。

三酰基甘油也叫做中性脂肪或甘油三酯。

### 脂肪酸的命名

在讨论脂肪酸代谢之前,先简述一下脂肪酸的命名是适当的。一个脂肪酸的系统名称是由它的母体烃衍生而来的。例如,  $C_{18}$  的饱和脂肪酸称为十八烷酸,因为母体烃为十八碳烷。有一个双键的  $C_{18}$  脂肪酸称为十八碳烯酸;有两个双键的称为十八碳二烯酸;有三个双键的称十八碳三烯酸。 $18:0$  这一符号表示没有双键的  $C_{18}$  脂肪酸,而  $18:2$  表示有两个双键。脂肪酸中碳原子的序号是从羧基末端开始的:



碳原子2和3常分别称为 $\alpha$ 和 $\beta$ 。在链的另一端的甲基碳原子称为 $\omega$ 碳。双键的位置用 $\Delta$ 符号和右上角的数字表示。例如,顺 $\Delta^9$ 表示在碳原子9和10之间有一顺型的双键;反 $\Delta^2$ 表示在碳原子2和3之间有一反型的双键。在生理pH下脂肪酸电离,因此根据其酸根的形式来称呼它们是适当的,例如:软脂酸根或十六烷酸根。

### 脂肪酸的链长和不饱和程度都不同

生物体系中的脂肪酸(表17-1)通常含有偶数的碳原子,典型的是在14到24之间。最常见的是16和18碳的脂肪酸。在动物的脂肪酸中,烃链几乎总是不分支的。烷基链可能是饱和的或者可能含有一个或多个双键。在大多数不饱和脂肪酸中双键的构型是顺型的。有多个双键的不饱和脂肪酸中的双键至少是由一个亚甲基隔开的。

脂肪酸和由它们所衍生的脂类的性质显著地决定于它们的链长和不饱和的程度。不饱和脂肪酸的熔点比同样长度的饱和脂肪酸的为低。例如,硬脂酸的熔点为 $69.6^\circ\text{C}$ ,而油酸(含

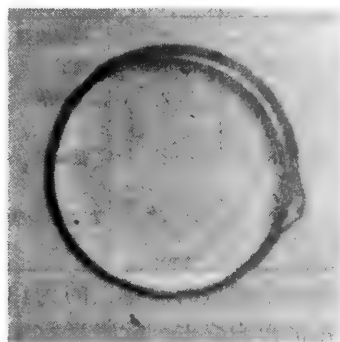


图17-1 脂肪细胞的显微照片。一个大的脂肪球被一薄层细胞质和凸出的细胞核所包被。[蒙Dr. Pedro Cuatrecasas特许。]

表 17-1 动物体内某些天然存在的脂肪酸

碳原子数	双键数	常用名	系 统 名	化 学 式
12	0	月桂酸	正-十二烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^-$
14	0	豆蔻酸	正-十四烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}^-$
16	0	软脂酸	正-十六烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$
18	0	硬脂酸	正-十八烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$
20	0	花生酸	正-二十烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$
22	0	山萘酸	正-廿二烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COO}^-$
24	0		正-廿四烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COO}^-$
16	1	棕榈油酸	顺- $\Delta^9$ -十六烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
18	1	油酸	顺- $\Delta^9$ -十八烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$
18	2	亚油酸	顺, 顺 $\Delta^9, \Delta^{12}$ -十八碳二烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
18	3	亚麻酸	全顺 $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ -十八碳三烯酸	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$
20	4	花生四烯酸	全顺 $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ -二十碳四烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$

有一个顺型的双键) 的为 $13.4^\circ\text{C}$ 。 $\text{C}_{18}$ 系列的含有多个双键的不饱和脂肪酸的熔点更低。链长也影响熔点, 软脂酸( $\text{C}_{16}$ )的熔点比硬脂酸( $\text{C}_{18}$ )的低 $6.5^\circ$ 这一事实就说明了这一点。因此, 短的链长和不饱和性提高脂肪酸及其衍生物的流动性。膜的流动性的意义已讨论过了(第10章)。

### 三酰基甘油类是高度密集的能量贮库

三酰基甘油类是代谢能的高度密集的贮库, 因为它们既是还原态的又是无水的。脂肪酸的完全氧化产生约 $9\text{ kcal/g}$ , 这与碳水化合物和蛋白质的 $4\text{ kcal/g}$ 不同。产热量的差别如此之大的原因是脂肪酸的还原程度高得多。其次, 三酰基甘油类的非极性很高, 所以是以几乎无水的形式贮藏的, 而蛋白质和碳水化合物的极性高得多, 因此水合程度也高得多。事实上, 一克干的糖原结合约两克的水。因而一克几乎无水的脂肪比一克水化的糖原可以贮藏大约六倍以上的能量。这就是进化过程中选中了三酰基甘油而不是糖原作

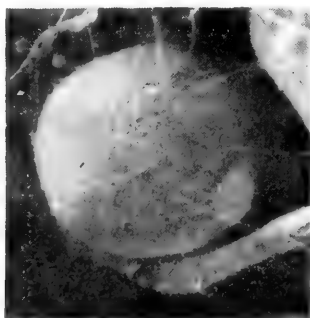


图 17-2 脂肪细胞的扫描电镜照片。[引自 *Tissues and Organs* by Richard G. Kessel and Randy H. Kardon. Copyright © 1979. W. H. Freeman and Company.]

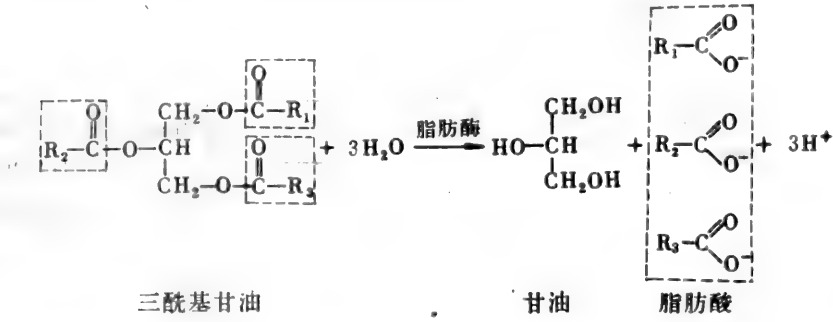
为主要能量贮库的原因。试考虑一个典型的70公斤的男人, 他有 $100,000\text{ kcal}$ 贮藏的燃料为三酰基甘油的形式,  $25,000\text{ kcal}$ 为蛋白质(大多在肌肉中),  $600\text{ kcal}$ 为糖原,  $40\text{ kcal}$ 为葡萄糖。三酰基甘油组成其总体重中的11公斤。假设这么多能量以糖原的形式贮藏, 那么他的体重将增加55公斤。

在哺乳动物体内, 积累三酰基甘油的主要部位是脂肪细胞的细胞质。三酰基甘油的小滴融合在一起形成一个球, 可能占据着细胞的大部分容积。脂肪细胞是特化的, 它专门合成和

贮藏三酰基甘油并将它们转化为燃料分子，然后通过血液运送到其它组织中去。

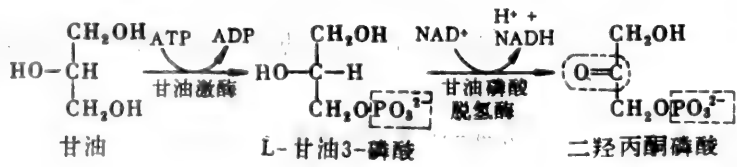
三酰基甘油被环AMP所调节的脂肪酶水解

利用脂肪作为能源的第一步变化就是三酰基甘油被脂肪酶水解。



脂肪细胞中脂肪酶的活性为激素所调节。肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素和促肾上腺皮质激素都促进脂肪细胞中的腺苷酸环化酶。然后环腺苷酸（cAMP）的高水平促进一种蛋白质激酶，此激酶将脂肪酶磷酸化而使之活化。因此，肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素和促肾上腺皮质激素都引起脂解作用。在活化脂肪细胞的脂解方面，cAMP是第二信使，这和它在活化糖原分解方面的作用（第16章）相同。胰岛素与此相反，它抑制脂解。

脂解所形成的甘油被磷酸化并还原为二羟丙酮磷酸，它又异构化为甘油醛3-磷酸。这一中间产物既是糖酵解途径的，又是葡糖异生途径的。因此，在含有这些酶的肝脏中，甘油可转变为丙酮酸或葡萄糖。由二羟丙酮磷酸还原为甘油3-磷酸，也能发生逆过程。由磷酸酶引起的水解则产生甘油。因此，甘油和糖酵解的中间产物是极易互相转变的。



脂肪酸通过相继除去二碳单位而降解

1904年，克诺普，F. (Franz Knoop)在阐明脂肪酸氧化的机理方面作出了关键性的贡献。他用ω-碳上联有苯基的直链脂肪酸喂狗。克诺普发现当用苯丁酸喂它们时，狗尿中含有苯乙酸的衍生物。反之，用苯丙酸喂时，则形成苯甲酸的衍生物。事实上，只要用含有偶数碳原子的脂肪酸喂就产生苯乙酸，而只要用奇数碳原子的脂肪酸喂，就产生苯甲酸（图17-3）。克诺普根据这些发现推断：脂肪酸是通过在β-碳原子上氧化而降解的。这些实验是生物化学的里程碑，因为这是首次用一种合成的标记去阐明反应机理。数十年后生物化学中才应用重

氢和放射性同位素。

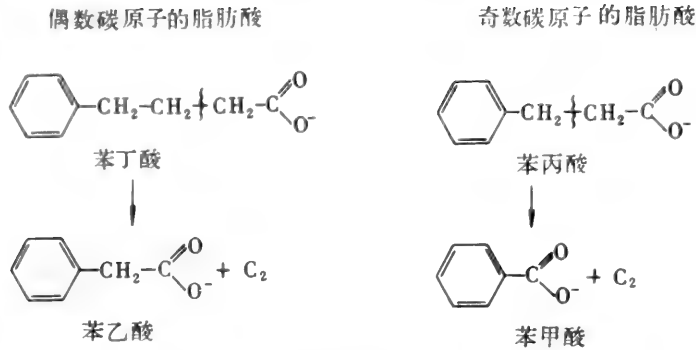
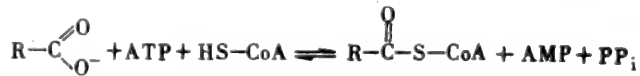


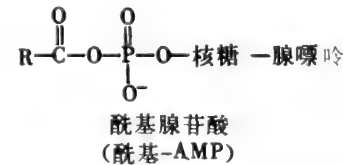
图 17-3 克诺普的实验，证明脂肪酸是由除去二碳单位而降解的。

### 被氧化前脂肪酸先与辅酶A 联结

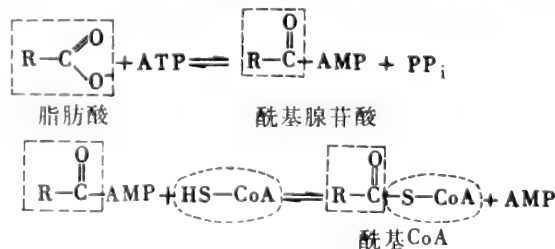
1949年，肯尼迪，E .(Eugene Kennedy) 和列宁格尔，A.(Albert Lehninger)证明脂肪酸是在线粒体中被氧化的。以后的工作证明在它们进入线粒体间质之前先要被活化。ATP 推动脂肪酸的羧基与CoA的硫氢基之间形成硫酯键。这一活化反应发生在线粒体膜上，是由酰基CoA合成酶（或称脂肪酸硫激酶）催化的。



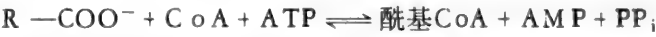
伯格，P.(Paul Berg) 证明脂肪酸的活化是分两步进行的。第一步，脂肪酸与ATP反应，形成酰基腺苷酸。



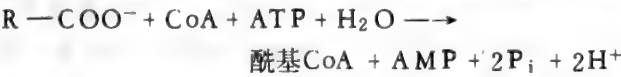
基腺苷酸。在这一混合酐中，脂肪酸的羧基与AMP的磷酰基成键。ATP底物的另外两个磷酰基



基则以焦磷酸的形式被释放。然后CoA的硫氢基攻击牢固结合在酶上的酰基腺苷酸，形成酰基CoA和AMP。这些部分反应都是完全可逆的。事实上，这两个反应的总和的平衡常数接近1。



打开一个高能键（PP<sub>i</sub>和AMP间的），又形成一个高能键（酰基CoA中的硫酯键）。那么，这个反应是怎样被推进的呢？答案是焦磷酸迅速被焦磷酸酶水解。

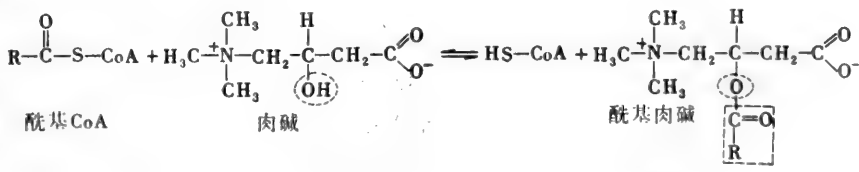


这就使得整个反应是不可逆的，因为消耗了两个高能键，而只形成了一个高能键。我们在这里又看到了生物化学中多次出现的真理的又一个例子；这一原理就是无机焦磷酸的水解使得许多生物合成反应成为不可逆的。

在这一活化反应中还有另一个重复出现的主题。与酶结合的酰基腺苷酸中间产物的存在并非酰基CoA的合成所独有的。当羧基在生化反应中被活化时常常形成酰基腺苷酸。例如，氨基酸就是通过类似的机理被活化而参加蛋白质合成的。

### 肉碱携带活化的长链脂肪酸进入线粒体间质

脂肪酸在线粒体外膜上被活化而在线粒体间质中被氧化。长链的酰基CoA分子不易透过线粒体内膜，所以需要一种特殊的转运机理。活化的长链脂肪酸是由肉碱携带着穿过线粒体内膜的。酰基从CoA的硫原子上转移到肉碱的羟基上形成酰基肉碱，它能扩散透过线粒体内膜。在此膜的间质侧，酰基又转移到CoA上，这种转移在热力学上是有利的，因为肉碱中的O-酰基键的基团转移势高。这些转酰基反应是由脂肪酰CoA:肉碱脂肪酸转移酶催化的。



可以预料，转移酶的缺陷或肉碱的缺乏都会减少长链脂肪酸的氧化。事实上已发现过同卵双生儿有这种失调现象，他们从童年的早期就感到肌肉痉挛的疼痛。饥饿、运动或高脂肪的饮食都加剧这种疼痛；在这三种状态下脂肪酸的氧化都是主要的产生能量的过程。糖酵解和葡糖异生的酶都是正常的。三酰基甘油的脂解是正常的，从饥饿后血浆中未酯化的脂肪酸的浓度升高就可看出这一点。肌肉的活组织检查证明长链的酰基CoA合成酶是充分活跃的。其次，链长中等的（C<sub>8</sub>和C<sub>10</sub>）脂肪酸也能正常地被代谢。已知链长中等的酰基CoA透入线粒体间质不需要肉碱。这一情况的报道突出地说明代谢物从细胞的一个区域流向另一个区域的减慢也能引起疾病。

脂肪酸氧化的每一轮都产生乙酰CoA, NADH和FADH<sub>2</sub>

饱和的酰基CoA是由重复进行的四个反应降解的。这四个反应是：与黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD) 相联的氧化作用、水化作用,与NAD<sup>+</sup>

相联的氧化作用和由CoA引起的硫解(图17-4)。这些反应的结果是脂肪酰链少了两个碳原子,并产生FADH<sub>2</sub>, NADH和乙酰CoA。格林, D. (David Green), 奥丘阿, S. (Severo Ochoa) 和林楠, F. (Feodor Lynen) 在阐明这一系列反应方面作出了重要贡献, 这些反应称为 $\beta$ -氧化途径。

每一轮降解反应中的第一个反应是酰基CoA脱氢酶催化的酰基CoA的氧化, 形成一烯酰CoA, 其C-2和C-3之间有一反型的双键。



值得注意的是酰基CoA的脱氢与柠檬酸循环中琥珀酸的脱氢非常相似。事实上, 脂肪酸降解的每一轮中的前三个反应和柠檬酸循环中的最后几步极为相似:



下一步是烯酰CoA水化酶催化的C-2和C-3间双键的水化。

反- $\Delta^2$ -烯酰CoA + H<sub>2</sub>O  $\rightleftharpoons$  L-3-羟酰基CoA  
烯酰CoA的水化也和延胡索酸和乌头酸的水化一样, 有立体结构的专一性。当反- $\Delta^2$ -双键被水化时只形成3-羟酰基CoA的L-异构体。这种酶也水化顺- $\Delta^2$ 双键, 但产物却是D-异构体。不久我们在讨论不饱和脂肪酸的氧化时还要涉及这一点。

烯酰CoA的水化是第二个氧化作用的序幕, 这一氧化作用把C-3上的羧基转变为酮基并产生NADH, 它是由L-3-羟酰基CoA脱氢酶催化的, 这种酶对羟酰基底物的L-异构体的专一性是绝对的。



前一个反应已将C-3上的亚甲基氧化为酮基。最后一步是3-酮酰基CoA被第二个CoA分子的硫氢基所裂解, 产生乙酰CoA和一个少两个碳原子的酰基CoA。这一硫解式的分裂是

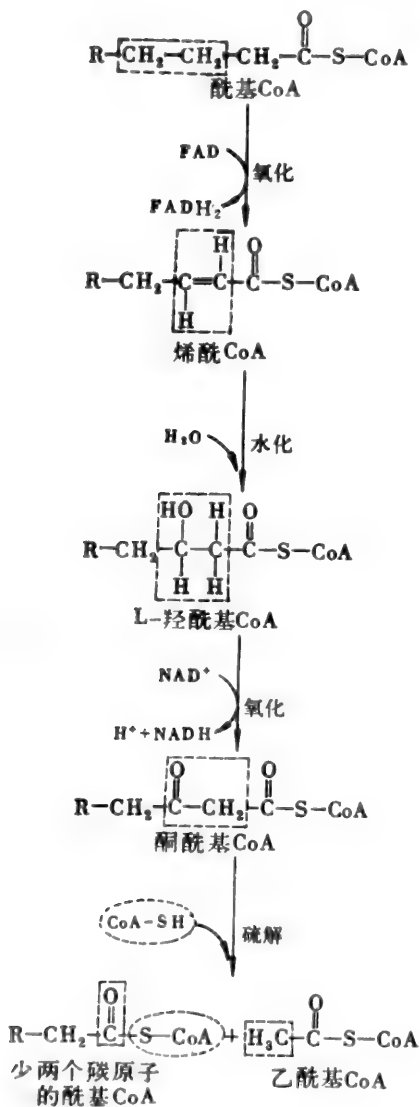
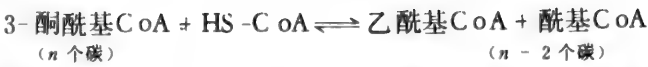


图17-4 脂肪酸降解的反应序列: 氧化、水化、氧化和硫解。

由β-酮硫解酶催化的。



然后缩短了的酰基CoA发生另一轮的氧化作用,开始于酰基CoA脱氢酶所催化的反应(图17-5)。就酰基的长度而论,β-酮硫解酶、羟酰基脱氢酶和烯酰CoA水化酶的专一性是广泛的。

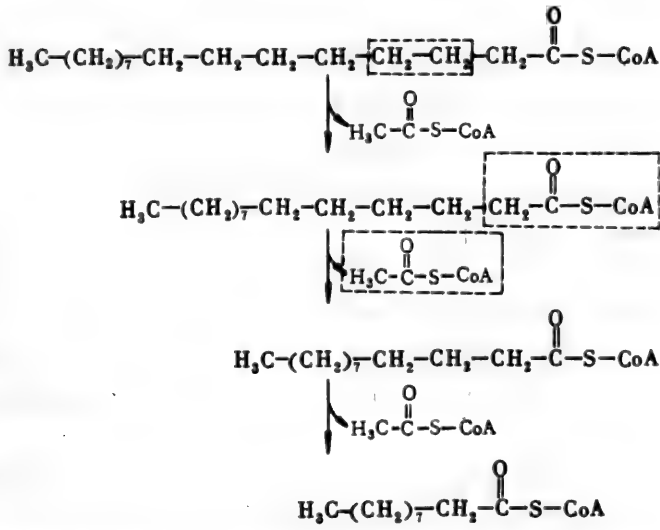


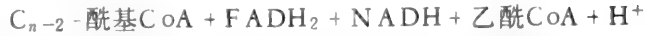
图17-5 软脂酸降解的前三轮。从脂肪酸的羧基端依次移去二碳单位。

表17-2 脂肪酸氧化的主要反应

步骤	反 应	酶
1	脂肪酸 + CoA + ATP $\rightleftharpoons$ 酰基CoA + AMP + PP <sub>i</sub>	酰基CoA合成酶 (亦称脂肪硫激酶; 脂肪酸:CoA连接酶 [AMP])
2	肉碱 + 酰基CoA $\rightleftharpoons$ 酰基肉碱 + CoA	脂肪酰CoA:肉碱脂肪酸转移酶
3	酰基CoA + E-FAD $\longrightarrow$ 反-Δ <sup>2</sup> -烯酰CoA + E-FADH <sub>2</sub>	酰基CoA脱氢酶 (有几种酶,各有不同的链长专一性)
4	反-Δ <sup>2</sup> -烯酰CoA + H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ L-3-羟酰基CoA	烯酰CoA水化酶 (亦称巴豆酸酶或3-羟酰基CoA水解酶)
5	L-3-羟酰基CoA + NAD <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ 3-酮酰基CoA + NADH + H <sup>+</sup>	L-3-羟酰基CoA脱氢酶
6	3-酮酰基CoA + CoA $\rightleftharpoons$ 乙酰CoA + 酰基CoA (少C <sub>2</sub> )	β-酮硫解酶 (亦称硫解酶)

## 软脂酸的完全氧化产生129个ATP

我们能够计算脂肪酸氧化时所产生的能量。在每一反应循环中，酰基CoA少了两个碳原子，并产生一个FADH<sub>2</sub>，一个NADH和一个乙酰CoA。



软脂酰CoA (C<sub>16</sub>-酰基CoA) 的降解需要七个反应循环。在第七轮中，C<sub>4</sub>-酮酰基CoA被硫解为两分子乙酰CoA。因此，软脂酰CoA氧化的化学计算关系为：



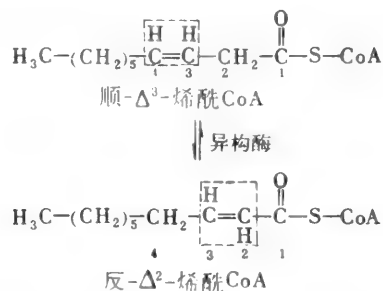
当每一NADH被呼吸链氧化时产生三个ATP，而每一FADH<sub>2</sub>氧化时产生两个ATP，因为它们的电子在辅酶Q的水平上进入呼吸链。回想一下，乙酰CoA通过柠檬酸循环氧化产生12个ATP。因此，软脂酰CoA氧化时所形成的ATP的数目为：来自7FADH<sub>2</sub>的14个，来自11NADH的21个，来自8分子乙酰CoA的96个，共计131个。在软脂酸的活化中消耗了两个高能磷酸键，那时ATP分解为AMP和2P<sub>i</sub>。因此，软脂酸完全氧化的净产量为129个ATP。

脂肪酸氧化的能量转化效率可根据所形成的ATP的数目和用量热法测得的软脂酸氧化为CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O的自由能进行估算。129个ATP水解的标准自由能为-940kcal (129 × -7.3 kcal)。软脂酸氧化的标准自由能为-2,340 kcal。因此，在标准状况下脂肪酸氧化的能量转化效率约为40%，此值与糖酵解、柠檬酸循环和氧化磷酸化的类似。

## 不饱和脂肪酸的氧化需要异构酶和差向异构酶

现在我们来讨论不饱和脂肪酸的氧化。许多反应都是与饱和脂肪酸相同的。事实上，要使许多不同的不饱和脂肪酸降解，只需两种额外的酶——一种异构酶和一种差向异构酶。

考虑棕榈油酸的氧化。这种C<sub>16</sub>的不饱和脂肪酸在C<sub>9</sub>和C<sub>10</sub>之间有一个双键，它是和软脂酸一样被活化并运过线粒体内膜的。然后棕榈油酰CoA发生三轮降解，这是和饱和脂

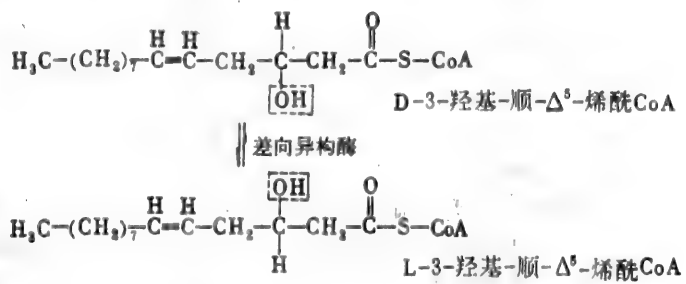


肪酸一样，由同样的酶进行的。可是，第三轮所形成的顺-Δ<sup>3</sup>-烯酰CoA不是酰基CoA脱氢酶的底物。C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>间双键的存在妨碍C<sub>2</sub>和C<sub>3</sub>间另一双键的形成。这一僵局是由一个



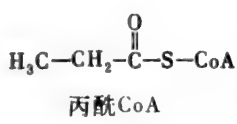
新的反应解决的，它把顺- $\Delta^3$ 双键的位置和构型都改变了。一种异构酶把这一双键变成了反- $\Delta^2$ 双键。以后的反应就是饱和脂肪酸氧化途径的反应，反- $\Delta^2$ -烯酰CoA为正常的底物。

多双键不饱和脂肪酸的氧化还需要第二种辅助性的酶。具有顺- $\Delta^6$ 和顺- $\Delta^9$ 双键的C<sub>18</sub>不饱和脂肪酸活化后通过饱和脂肪酸氧化途径发生两轮降解。然后顺- $\Delta^2\Delta^5$ -烯酰CoA被烯酰CoA水化酶所水化，此酶就是饱和酸途径中水化反- $\Delta^2$ 双键的同样的酶。不过，顺- $\Delta^2$ 双键的水化产生3-羟酰基CoA的D-异构体，它不是L-3-羟酰基CoA脱氢酶的底物。这一障碍是由一种差向异构酶克服的，它使C-3上羟基的构型发生改变。



### 最后的硫解一步中奇数链脂肪酸 产生丙酰辅酶A

具有奇数碳原子的脂肪酸是少见的。它们和具有偶数碳原子的脂肪酸一样被氧化，不过在最后一轮降解中产生的是丙酰CoA和乙酰CoA而不是两分子乙酰CoA。丙酰CoA中活化的



三碳单位在转变为琥珀酰CoA后进入柠檬酸循环。丙酰CoA转变为琥珀酰CoA的途径将在下一章（319页）中讨论，因为在几种氨基酸的氧化中也形成丙酰CoA。

### 假若脂肪分解占优势就由乙酰CoA形成酮体

假若脂肪和碳水化合物的降解适当平衡，脂肪酸氧化所形成的乙酰CoA就进入柠檬酸循环。“脂肪在碳水化合物的火焰中燃烧”这一句话的分子基础目前已清楚了。乙酰CoA进入柠檬酸循环决定于形成柠檬酸所需要的草酰乙酸的多少。不过，如果脂肪分解占优势，那么乙酰CoA就发生另一种变化。其理由如果没有碳水化合物或不能正常利用它，草酰乙酸的浓度就降低。在饥饿时或患糖尿病时，草酰乙酸被用于形成葡萄糖因而不能用于与乙酰CoA缩合。在这些情况下，乙酰CoA就被用于乙酰乙酸和D-3-羟基丁酸的形成。乙酰乙酸、D-3-

羟基丁酸和丙酮有时称为酮体。

乙酰乙酸是通过三个步骤由乙酰CoA形成的(图17-6)。两分子乙酰CoA缩合形成乙酰乙酰CoA。这一反应是由硫解酶催化的,它是脂肪酸氧化中硫解步骤的逆转。然后乙酰乙酰CoA、

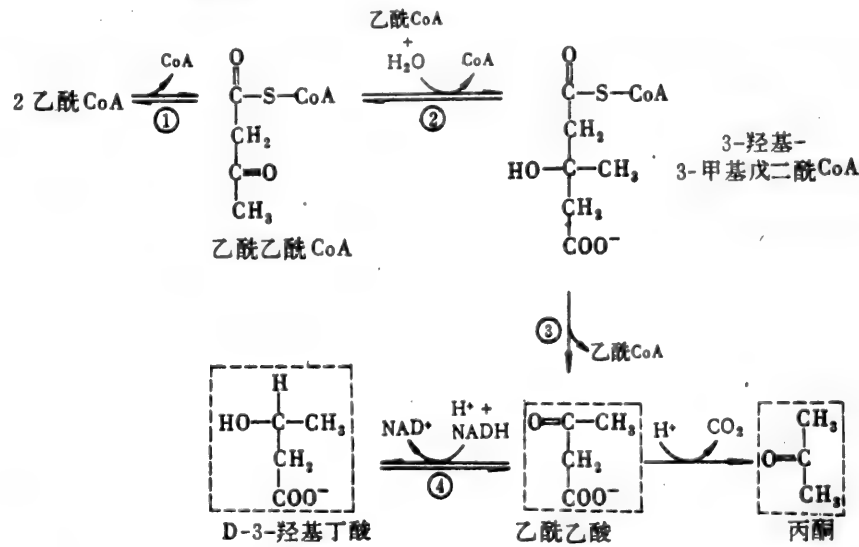
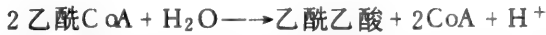


图17-6 由乙酰CoA形成乙酰乙酸、D-3-羟基丁酸和丙酮。催化这些反应的酶是：(1)3-酮硫解酶，(2)羟甲基戊二酰CoA合成酶，(3)羟基甲基戊二酰CoA裂解酶，(4)D-3-羟基丁酸脱氢酶。乙酰乙酸自动脱羧形成丙酮。

乙酰CoA和水相互作用,产生3-羟基-3-甲基-戊二酰CoA和CoA。形成乙酰乙酰CoA的不利的平衡为这一反应的有利的平衡所补偿,这一平衡之所以有利是由于硫酯键的水解。然后3-羟基-3-甲基-戊二酰CoA裂解为乙酰CoA和乙酰乙酸。这些反应的总和是:



乙酰乙酸在线粒体间质中还原而形成3-羟基丁酸。羟基丁酸与乙酰乙酸的比值视线粒体内NADH/NAD<sup>+</sup>的比值而定。乙酰乙酸也进行一种自发的脱羧作用,形成丙酮。血液中乙酰乙酸水平高的人,可由他呼出的气中嗅到丙酮的气味。

### 乙酰乙酸是某些组织中的主要燃料

产生乙酰乙酸和3-羟基丁酸的主要部位是肝脏。这些物质从肝的线粒体扩散到血液中并运送到外围的组织中去。直到几年以前,还认为这些酮体是没有什么生理价值的降解产物。卡希尔, G .(George Cahill) 等的研究揭示出乙酰CoA的这些衍生物是能量代谢中的重要分子。乙酰乙酸和3-羟基丁酸是呼吸作用的正常燃料(图17-7)并且在量上也是重要的能源。事实上,心肌和肾脏皮质比葡萄糖优先利用乙酰乙酸。反之,营养良好的人食用平衡的饮食时脑的主要燃料是葡萄糖。然而,在饥饿时和患糖尿病时脑能适应于利用乙酰乙酸。长期饥饿时,脑对燃料的需要有75%是由乙酰乙酸满足的。

通过一种专一的CoA转移酶催化CoA从琥珀酰CoA转移到乙酰乙酸上的反应,可将

乙酰乙酸活化。然后乙酰乙酸CoA被硫解酶裂解，产生两分子乙酰CoA，乙酰CoA再进入柠檬酸循环。肝脏只能向其它器官供应乙酰乙酸，因为它没有专一的CoA转移酶。

乙酰乙酸可以看作是乙酰基单位的水溶性的、可转运的形式。脂肪酸由脂肪组织释放并由肝脏转变成乙酰基单位，然后它们又作为乙酰乙酸由肝脏向外输送。如所预料，乙酰乙酸也有调节作用。血液中乙酰乙酸水平高表示乙酰基单位太多并使脂肪组织中脂解的速率降低。

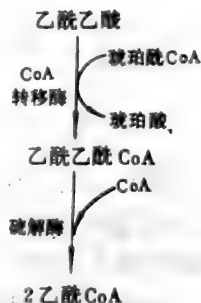


图17-7 利用乙酰乙酸作为燃料。乙酰乙酸可被转变为二分子乙酰CoA，后者再进入柠檬酸循环。

### 动物不能将脂肪酸转变为葡萄糖

重要的是应注意到动物不能将脂肪酸转变为葡萄糖。具体地说，动物体内乙酰CoA不能转变为丙酮酸或草酰乙酸。乙酰CoA的乙酰基中的两个碳原子进入柠檬酸循环，但是在异柠檬酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶所催化的脱羧反应中两个碳原子离开柠檬酸循环。当然，草酰乙酸会再生出来，但它并不是在乙酰CoA的乙酰单位被柠檬酸循环氧化时重新形成的。植物与动物不同，植物有两种额外的酶，能把乙酰CoA的碳原子转变为葡萄糖（见310页习题6）。

### 脂肪酸通过不同途径合成和降解

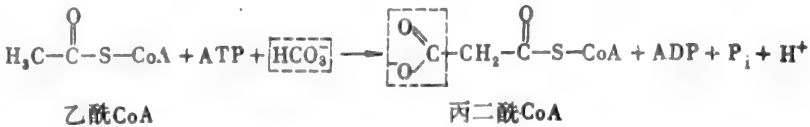
脂肪酸的合成并不是通过降解途径的逆转而进行的，而是由一套新系列的反应组成的。这又一次说明了下列原理：生物体系中的合成途径和降解途径通常都是不同的。脂肪酸合成途径的一些重要特征是：

1. 合成在细胞溶质中发生，与降解在线粒体间质中发生不同。
2. 脂肪酸合成的中间产物与酰基载体蛋白(ACP)的巯基形成共价键，而脂肪酸降解的中间产物与辅酶A形成键。
3. 高等生物的脂肪酸合成的许多酶组成一种多酶复合体称为脂肪酸合成酶。降解的酶与此相反，似乎不是结合在一起的。
4. 生长中的脂肪酸链的加长是逐步加入来自乙酰CoA的二碳单位。延长步骤中活化的二碳单位供体是丙二酰-ACP。延长反应是由 $\text{CO}_2$ 的释放推动的。
5. 脂肪酸合成的还原剂是NADPH。
6. 脂肪酸合成酶复合物所引起的延长终止于软脂酸( $\text{C}_{16}$ )。进一步的延长和双键的插入是由别的酶体系完成的。

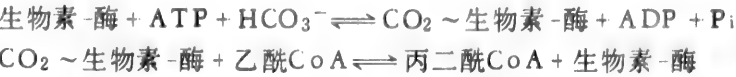
### 丙二酰辅酶A的形成是脂肪酸合成的关键步骤

瓦基尔，S. (Salih Wakil) 发现脂肪酸的生物合成需要重碳酸盐，这是阐明这一过程的

重要线索。事实上，脂肪酸的合成始于乙酰CoA羧化为丙二酰CoA。这一不可逆的反应是脂肪酸合成的关键步骤。



丙二酰CoA的合成是**乙酰CoA羧化酶**催化的，此酶有一生物素辅基。生物素的羧基共价连接在赖氨酸残基的ε-氨基上，和丙酮酸羧化酶中一样（266页）。乙酰CoA羧化酶和丙酮酸羧化酶之间的另一相似之处就是乙酰CoA是分两个阶段羧化的。第一步是消耗ATP而形成一种羧基生物素中间产物。这一中间产物中活化的CO<sub>2</sub>基团再转移到乙酰CoA上形成丙二酰CoA。



底物结合在酶上，产物则以一种特定的顺序释放出来(图17-8)。乙酰CoA羧化酶代表了一种**乒乓反应机理**，在此反应中所有底物被结合之前有一种或多种产物释放出来。

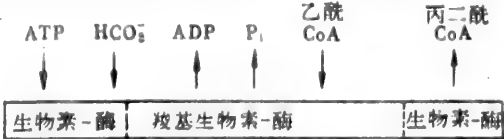


图17-8 乙酰CoA羧化酶的反应序列。

大肠杆菌的乙酰CoA羧化酶已被分离成几个亚基，它们分别催化部分的反应。生物素以共价连在一称为**生物素羧基载体蛋白**的小蛋白（22kdal）上。这一载体蛋白中生物素单位

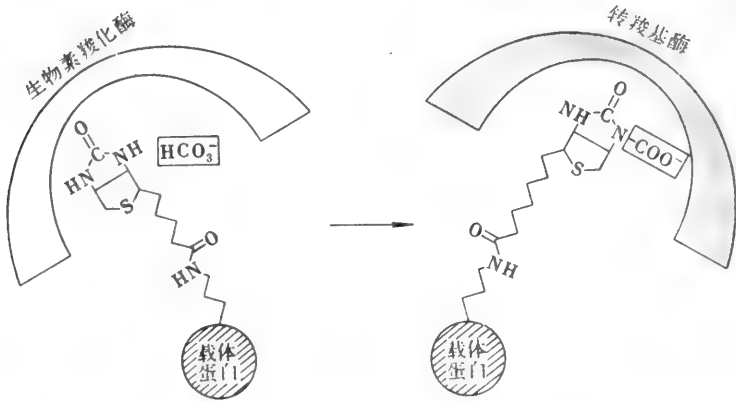


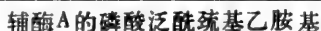
图17-9 示意图，说明一种假设的生物素辅基的移动。它从接受HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的羧基的部位移动到把这一基团给予乙酰CoA的部位。

在真核生物中，乙酰CoA羧化酶以一种无酶活性的原体(450kdal)或一种有酶活性的丝状聚合体形式存在(图17-10)。这种相互转变是受到变构调节的，这是可以预料到的，因为乙酰CoA羧化酶催化脂肪酸合成中的第一个关键反应。关键性的变构活化剂是柠檬酸，它使酶的平衡偏于有活性的丝状形式。在丝状形式中生物素与其底物所成的取向是最适的。反之，软脂酰CoA却使平衡偏于无活性的原体形式。所以，终产物软脂酰CoA抑制脂肪酸合成的第一个关键步骤。大肠杆菌中乙酰CoA羧化酶的控制与真核生物中的十分不同。在细菌中，脂肪酸主要是磷脂类的前体而不是贮藏燃料的前体，所以其控制不同。柠檬酸对大肠杆菌的酶无影响。而是其转羧基酶组分的活性为鸟嘌呤核苷酸所调节，鸟核苷酸在脂肪酸合成与细菌的生长和分裂间进行协调。



图 17-10 鸡肝脏的乙酰CoA 羧化酶的有酶活性的丝状形式的电镜照片。[蒙 Dr. M. Daniel Lane 特许。]

瓦杰罗斯, P.R. (P.Roy Vagelos) 发现脂肪酸合成的中间产物都是连在一个酰基载体蛋白上的。具体地说, 它们是连在磷酸泛酰巯基乙胺的末端巯基上的 (图 17-11)。在脂肪酸的降解中, 这一单位是 CoA 的一部分; 而在合成中, 它是连在 ACP 的丝氨酸残基上的。这个有 77 个残基的单个的多肽链可以看作是一个巨大的辅基——“大 CoA”。



303

## 脂肪酸合成中的延长循环

催化由乙酰CoA、丙二酰CoA和 NADPH 合成长链饱和脂肪酸的酶体系称为**脂肪酸合酶**。它以多酶体系的形式存在于高等生物体内。细菌的脂肪酸合成酶与此相反，当细胞被破碎时，其组分酶都是分开的。这些分离的酶的存在曾有利于阐明脂肪酸合成中的各个步骤（表17-3）。事实上，高等生物体内导致脂肪酸合成的反应非常象细菌中的那些反应。

表 17-3 脂肪酸合成的主要反应

步骤	反 应	酶
1	$\text{乙酰CoA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{丙二酰CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$	乙酰CoA羧化酶
2	$\text{乙酰CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{乙酰-ACP} + \text{CoA}$	乙酰转酰基酶
3	$\text{丙二酰CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{丙二酰-ACP} + \text{CoA}$	丙二酰转酰基酶
4	$\text{乙酰-ACP} + \text{丙二酰-ACP} \longrightarrow \text{乙酰乙酰-ACP} + \text{ACP} + \text{CO}_2$	酰基-丙二酰-ACP缩合酶
5	$\text{乙酰乙酰-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{D-3-羟丁酰-ACP} + \text{NADP}^+$	$\beta$ -酮酰基-ACP还原酶
6	$\text{D-3-羟丁酰-ACP} \rightleftharpoons \text{巴豆酰-ACP} + \text{H}_2\text{O}$	3-羟酰基-ACP脱水酶
7	$\text{巴豆酰-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{丁酰-ACP} + \text{NADP}^+$	烯酰-ACP还原酶

脂肪酸合成的延长阶段开始于乙酰-ACP和丙二酰-ACP的形成。乙酰转酰基酶和丙二酰转酰基酶催化这两个反应。



丙二酰转酰基酶的专一性很强，而乙酰转酰基酶则能转移乙酰单位以外的酰基，不过速率要慢得多。含有奇数碳原子的脂肪酸是从丙酰-ACP开始合成的，丙酰-ACP是在乙酰转乙酰酶作用下由丙酰CoA形成的。

乙酰-ACP和丙二酰-ACP反应，形成乙酰乙酰-ACP。这一缩合反应是由酰基-丙二酰基-ACP缩合酶催化的。



在此缩合反应中，一个四碳单位是由一个二碳单位和一个三碳单位形成的，并释放 $\text{CO}_2$ 。为什么四碳单位不是由两个二碳单位形成的呢？换言之，为什么反应物是乙酰-ACP和丙二酰-ACP而不是两个分子的乙酰-ACP呢？答案是平衡十分不利于由两个乙酰-ACP分子合成乙酰乙酰-ACP。反之，如果丙二酰-ACP是一个反应物则对平衡有利，因为它的脱羧使自由能减少很多。实际上，这一缩合反应是由ATP推动的，虽然ATP并不直接参与这一缩合反应，而是在乙酰CoA羧化为丙二酰CoA时利用了ATP以形成一高能的底物。羧化反应中贮藏在丙二酰CoA中的自由能在脱羧反应中释放出来，同时形成乙酰乙酰-ACP。虽然脂肪酸合成需要 $\text{HCO}_3^-$ ，但它的碳原子并不在产物中出现。而是所有偶数碳原子的脂肪酸中的碳都是来自乙酰CoA的。

脂肪酸合成的以下三个步骤是把C-3上的酮基还原为亚甲基（图17-12）。首先，乙酰乙酰-ACP被还原为D-3-羟基丁酰-ACP。这一反应与脂肪酸降解中相应的反应有两方面的区别：（1）形成的是D-而不是L-差向异构体；（2）还原剂是NADPH，而 $\beta$ -氧化中 $\text{NAD}^+$ 是氧化剂。这一差别也说明了下列一般原理，即NADPH消耗于生物合成反应，而NADH

产生于供能反应。然后D-3-羟丁酰-ACP脱水,形成巴豆酰-ACP,它是反- $\Delta^2$ -烯酰基-ACP。这一循环的最后一步将巴豆酰-ACP还原为丁酰-ACP。还原剂又是NADPH,而在 $\beta$ -氧化的相应反应中FAD是氧化剂。这最后三个反应——一个还原反应、一个脱水反应和第二个还原反应——将乙酰乙酰-ACP转变为丁酰-ACP,于是第一轮延长循环结束。

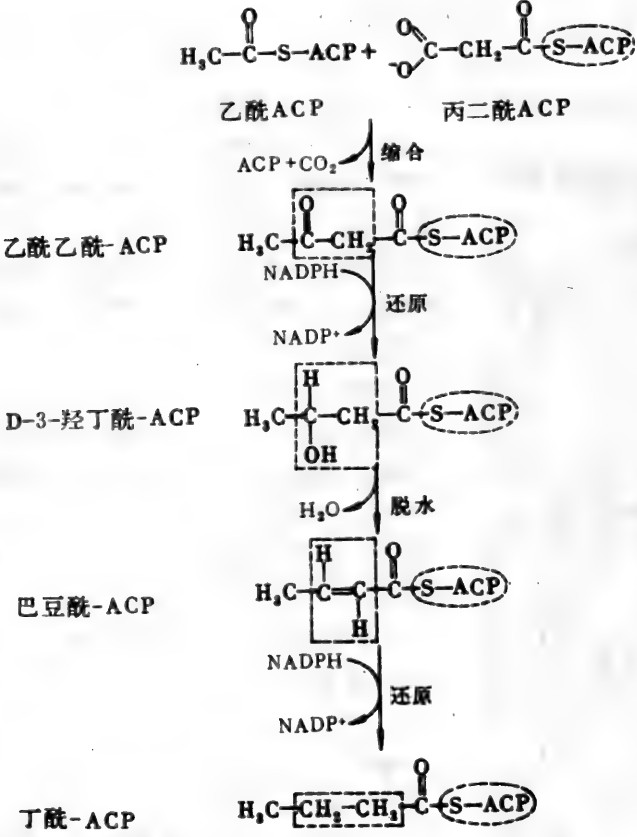
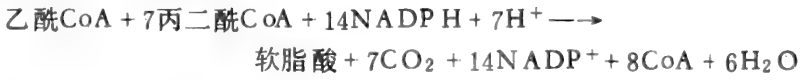


图17-12 脂肪酸合成的反应序列：缩合、还原、脱水和还原。此  
处所列的中间产物是在合成的第一轮中形成的。

在脂肪酸合成的第二轮中,丁酰-ACP与丙二酰-ACP缩合,形成—C<sub>6</sub>— $\beta$ -酮酰基-ACP。这一反应与第一轮中的相象,那一轮中是乙酰-ACP与丙二酰-ACP缩合形成C<sub>4</sub>- $\beta$ -酮酰基-ACP。还原作用、脱水作用和第二个还原作用把C<sub>6</sub>- $\beta$ -酮酰基-ACP转变为C<sub>6</sub>-酰基-ACP,这又为第三轮延长作好了准备。延长循环继续进行直到形成C<sub>16</sub>-酰基-ACP为止。这一中间产物不是缩合酶的底物,它被水解为软脂酸和ACP。

### 脂肪酸合成的化学计算

软脂酸合成的化学计算关系为:



上列反应所用的丙二酰CoA合成的方程式为:



因此,软脂酸合成的全部化学计算关系为:



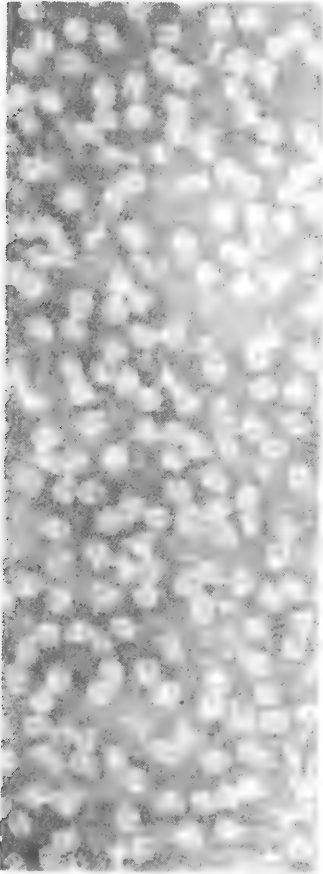
### 真核生物体内脂肪酸是由一多酶复合物合成的

真核生物的脂肪酸合成酶与细菌的不同,是确定无疑的多酶复合物。从酵母得到的此复合物质量为2,300kda1,在电镜照片上呈椭圆体状,长250Å,横断面直径210Å (图17-13)。它是由两种多肽链组成的,每种由一单个的基因编码。亚基A(185kda1)含有酰基载体蛋白、缩合酶和β-酮酰基还原酶,而亚基B(175kda1)含有乙酰转酰基酶、丙二酰转酰基酶、β-羟酰基脱水酶和烯酰基还原酶。哺乳类的脂肪酸合成酶(400kda1)也是由两种亚基组成的,这些亚基与酵母中的类似。事实上,许多真核生物的多酶复合物是由多功能的蛋白质组成的,不同的酶以共价方式结合在一单个的多肽链中。这种排列的一个优点就是不同的酶的合成是协同的。其次,由共价连接在一起的酶组成的多酶复合物比由非共价结合在一起的要稳定些。

林楠(Lynen)假定生长中的脂肪酸链是在每一轮延长中先从ACP转移到缩合酶上然后又转移回来。第一次的移位给进来的丙二酰单位空出地方,而第二次的移位则在缩合阶段发生。在蛋白质合成中也有类似的移位,注意到这一点是重要的。

磷酸泛酰巯基乙胺部分的灵活性和最大长度为20Å似乎对多酶复合物的功能有关键性的意义,因为它们使得生长中的脂肪酸链能够与复合物中的每一种酶的活性部位密切接触。酶的亚基不需要发生结构上的重大重排就可与底物相互作用。而是底物在一长的、灵活的臂上,这个臂能达到每一个活性部位。回忆一下,生物素和硫辛酰胺也都是在其多酶复合物的长的灵活的臂上。酵母和高等生物的脂肪酸合成酶的有组织结构提高了整个过程的效率,因为中间产物是直接从一个活性部位转移到另一个活性部位。反应物在细胞溶质中不被稀释。其次,它们也不必通过随机的扩散而彼此相遇。这种多酶复合物的另一个优点

就是以共价结合着的中间产物被隐藏起来了,可避免竞争性的反应。



1000 Å

图17-13 酵母的脂肪酸合成酶复合物的电镜照片。[蒙Dr. Felix Wieland and Dr. Elmar A. Siess 特许。]



## 柠檬酸将乙酰基从线粒体带到细胞溶质中

### 以用于脂肪酸的合成

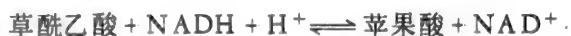
软脂酸的合成需要输入 8 个分子的乙酰CoA, 14个NADPH和 7 个ATP。脂肪酸是在细胞溶质中合成的, 而乙酰CoA是在线粒体中由丙酮酸形成的。因此, 乙酰CoA必须从线粒体运到细胞溶质中去以用于脂肪酸合成。可是, 线粒体对乙酰CoA的透性不大。回想一下, 肉碱只携带长链脂肪酸。对乙酰CoA的障碍是由柠檬酸克服的, 它携带乙酰基穿过线粒体内膜。在线粒体间质中由乙酰CoA与草酰乙酸的缩合形成柠檬酸。柠檬酸扩散到细胞溶质中, 再为柠檬酸裂解酶\*所裂解:



因此, 乙酰CoA和草酰乙酸是在消耗ATP的条件下从线粒体转移到细胞溶质中的。

### 脂肪酸合成所用NADPH的来源

把乙酰基转移到细胞溶质时所形成的草酰乙酸现在必须返回到线粒体中去。线粒体内膜不令草酰乙酸透过。因此需要一系列绕道的反应。最重要的是, 这些反应产生脂肪酸合成所需要的大部分NADPH。首先, 草酰乙酸被NADH还原为苹果酸。这一反应是由细胞溶质中的苹果酸脱氢酶催化的。



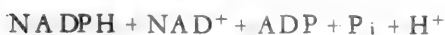
第二, 苹果酸发生氧化性脱羧, 这是由NADP<sup>+</sup>-苹果酸酶催化的。这一反应是以前未曾提到过的。



这一反应中所形成的丙酮酸迅速扩散到线粒体内并被丙酮酸羧化酶羧化为草酰乙酸。



这三个反应的总和为



因此, 每有一个乙酰CoA从线粒体中转移

到细胞质中, 就产生一个NADPH (图17-14)。因此, 当八个分子的乙酰CoA转移到细胞溶质中以合成软脂酸时, 就形成八个NADPH。这一过程所需要的另外六个NADPH则来自戊糖磷酸途径。

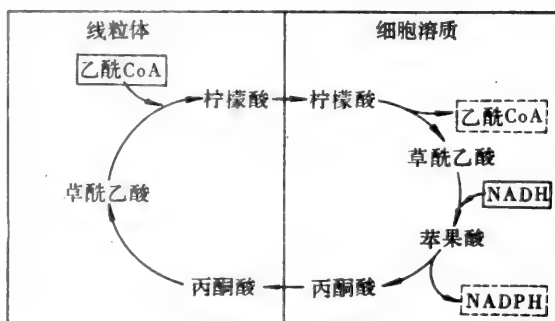
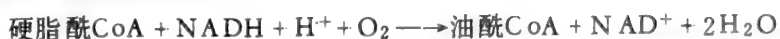


图17-14 乙酰CoA从线粒体中转移到细胞溶质中, 同时这一系列反应将NADH转变为NADPH。

\* 裂解酶——催化C—C, C—O或C—N键裂解的酶, 作用方式是消除。这些反应中通常形成双键。

## 辅助的酶体系实现脂肪酸的延长和去饱和化

脂肪酸合成酶的主要产物是软脂酸。在真核生物中，更长的脂肪酸是由延长反应所形成的，催化这些反应的酶体系是与内质网膜（亦称微粒体体系）结合的。二碳单位加到饱和的和不饱和的脂肪酸的羧基末端上。微粒体体系也向长链的酰基CoA中引入双键。例如，当硬脂酰CoA转变为油酰CoA时即由一种氧化酶引入一顺- $\Delta^9$ -双键，此种氧化酶利用分子态氧和NADH（或NADPH）：



通过延长反应和去饱和反应的结合，可以由油酸形成各种各样的不饱和脂肪酸。例如，油酸可延长为20：1顺- $\Delta^{11}$ 脂肪酸。另一方面，也可以引入第二个双键而形成18：2顺- $\Delta^6$ ， $\Delta^9$ 脂肪酸。与此类似，软脂酸（16：0）也能被氧化而形成棕榈油酸（16：1顺- $\Delta^9$ ），它又可再延长为顺-11-十八烯酸（18：1顺- $\Delta^{11}$ ）。

哺乳类没有能向脂肪酸链中C-9以外的碳原子上引入双键的酶。因此，哺乳类不能合成亚油酸（18：2顺- $\Delta^9$ ， $\Delta^{12}$ ）和亚麻酸（18：3顺- $\Delta^9$ ， $\Delta^{12}$ ， $\Delta^{15}$ ）。亚油酸和亚麻酸是两种必需的脂肪酸。“必需”一词的意思是必须在饮食中供应它们，因为它们为机体所需要而又不能在体内合成。饮食中所提供的亚油酸和亚麻酸是合成许多其它不饱和脂肪酸的起点。哺

前 体	化 学 式
亚麻酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_1-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$
亚油酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$
棕榈油酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$
油酸	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$

乳动物体内的不饱和脂肪酸是由棕榈油酸（16：1）、油酸（18：1）、亚油酸（18：2）或亚麻酸（18：3）衍生而来的。一种不饱和脂肪酸中 $\omega$ - $\text{CH}_3$ 基团与最近的双键之间亚甲基碳的数目就确定了它的前体应该是什么。

## 脂肪酸合成的控制

当碳水化合物丰富而脂肪酸水平又低时，脂肪酸的合成最多最快。短期的和长期的控制机理都是重要的。细胞溶质中柠檬酸的浓度是脂肪酸合成中最重要的短期调节因素。正如前已指出的，柠檬酸促进乙酰CoA羧化酶，此酶是催化脂肪酸合成的关键步骤。当乙酰CoA和ATP都丰富时柠檬酸的水平就高。回想一下，异柠檬酸脱氢酶为高能荷所抑制（231页）。因此，柠檬酸水平高表示有二碳单位和ATP供脂肪酸合成之用。柠檬酸对乙酰CoA羧化酶的影响为软脂酰CoA所抵消，当脂肪酸过量时软脂酰CoA就多。软脂酰CoA也抑制把柠檬酸从线粒体运入细胞溶质的载体。此外，软脂酰CoA还抑制葡萄糖6-磷酸脱氢酶产生NADPH的作用。

长期控制是依靠参与脂肪酸合成的酶类合成和降解的速率变化来调节的。这种类型的调节也称为适应性的控制。经受过饥饿的动物，在饲喂高碳水化合物和低脂肪的饲料之后数天内，其肝脏中乙酰CoA羧化酶和脂肪酸合成酶的量就显著增加。

## 概 要

脂肪酸在生理上是重要的，因为它既是磷脂和糖脂的组分又是燃料分子。它们以三酰基

甘油（中性脂肪）的形式贮存在脂肪组织中，中性脂肪可由脂肪酶的水解作用而被动员，脂肪酶又是在激素控制之下的。脂肪酸被活化成酰基CoA，由肉碱转运通过线粒体内膜，并在线粒体间质中经由重复的四个反应序列而降解。这四个反应是：与FAD相连的氧化作用，水化作用，与NAD<sup>+</sup>相连的氧化作用和被CoA硫解的作用。氧化步骤中所形成的FADH<sub>2</sub>和NADH通过呼吸链把它们的电子传递给O<sub>2</sub>，而硫解步骤中所形成的乙酰CoA在正常情况下则与草酰乙酸缩合而进入柠檬酸循环。当草酰乙酸的浓度不够时，乙酰CoA就产生乙酰乙酸和3-羟基丁酸，它们都是正常的燃料分子。在饥饿时和患糖尿病时，大量的乙酰乙酸、3-羟基丁酸和丙酮（总称为酮体）聚积在血液中。哺乳类不能把脂肪酸转变为葡萄糖，因为没有使乙酰CoA净产生草酰乙酸、丙酮酸或其它葡萄糖异生的中间产物的途径。

脂肪酸是在细胞溶质中通过与 $\beta$ -氧化不同的途径合成的。合成开始于乙酰CoA羧化为丙二酰CoA。这一由ATP推动的反应是由乙酰CoA羧化酶催化的，它是一种生物素-酶。柠檬酸通过变构作用促进脂肪酸合成中的这一关键步骤。脂肪酸合成的中间产物都是连在一种酰基载体蛋白(ACP)上的，具体地说，就是连在其磷酸泛酰巯基乙胺辅基的末端硫氢基上的。由乙酰CoA形成乙酰-ACP，而由丙二酰CoA形成丙二酰-ACP。乙酰-ACP与丙二酰-ACP缩合形成乙酰乙酰-ACP，此反应是由活化的丙二酰单位释放CO<sub>2</sub>所推动的。此后是一个还原反应、一个脱水反应和第二个还原反应。NADPH是这些步骤中的还原剂。这样形成的丁酰-ACP就为第二轮的延长作好了准备，第二轮又是从丙二酰-ACP加入一个二碳单位开始的。七轮延长反应产生软脂酰-ACP，它再被水解为软脂酸。软脂酸的合成需要八个分子的乙酰CoA，十四个NADPH和七个ATP。在高等生物中，进行脂肪酸合成的酶是组织成一种多酶复合物的。这一复合物中的两种多肽链含有若干种共价连接的酶。以柠檬酸的裂解为基础的反应循环将乙酰基从线粒体中带到细胞溶质中并产生一些所需要的NADPH。其余的NADPH是由戊糖磷酸途径形成的。内质网膜上的酶体系使脂肪酸延长和不饱和化。哺乳类没有向C-9以外引入双键的酶，因此其饮食中需要亚油酸和亚麻酸。

## 习 题

1. 写出甘油转变为丙酮酸的平衡方程式。除糖酵解途径中的酶外还需要什么酶？
2. 写出硬脂酸转变为乙酰乙酸的平衡方程式。
3. 比较脂肪酸氧化和合成的下列几个方面：
  - (a) 过程的部位
  - (b) 酰基的载体
  - (c) 氧化剂和还原剂
  - (d) 中间产物的立体化学
  - (e) 合成或降解的方向
  - (f) 酶体系的组织
4. 指出下列每种不饱和脂肪酸生物合成的前体在动物体内是棕榈油酸、油酸、亚油酸或亚麻酸中的哪一种。
  - (a) 18:1 顺 $\Delta^{11}$
  - (b) 18:3 顺 $\Delta^6$ ,  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$
  - (c) 20:2 顺 $\Delta^{11}$ ,  $\Delta^{14}$
  - (d) 20:3 顺 $\Delta^5$ ,  $\Delta^8$ ,  $\Delta^{11}$

(e) 22:1 顺  $\Delta^{13}$

(f) 22:6 顺  $\Delta^4, \Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}, \Delta^{19}$

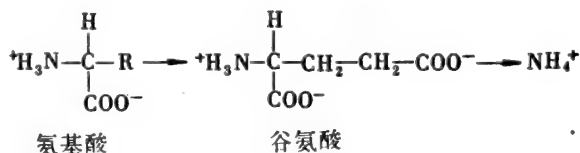
5. 考虑一个细胞提取物，它合成软脂酸的活性很高。假定此制剂中的脂肪酸合成酶大约五分钟内形成一个软脂酸。突然向此体系中加入大量丙二酰CoA，其丙二酰单位中的每一个碳都为 $^{14}\text{C}$ 所标记，一分钟后通过改变pH而使脂肪酸合成停止。分析上清液中脂肪酸的放射性。这一体系所形成的软脂酸中哪一个碳原子放射性较强——C-1或C-14？
6. 在某些植物和微生物中柠檬酸循环发生一些变化。它们含有异柠檬酸酶和苹果酸合成酶，这是动物体内没有的两种酶。异柠檬酸酶催化异柠檬酸的醛醇裂解，形成琥珀酸和乙醛酸 ( $\text{OHC}-\text{COO}^-$ )，而苹果酸合成酶则催化乙酰CoA、乙醛酸和水形成苹果酸的反应。
- (a) 假若没有异柠檬酸脱氢酶而有苹果酸脱氢酶，在这些生物体内乙酰CoA能形成草酰乙酸吗？如果能试写出这一转变的平衡方程式。
- (b) 这些生物能够从乙酰CoA合成葡萄糖吗？

## 第18章 氨基酸降解和脲循环

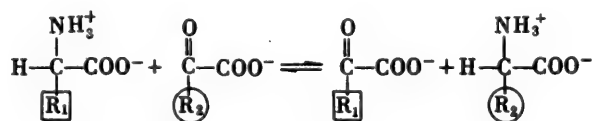
超过蛋白质和其它生物分子合成所需要的氨基酸不能被贮藏起来,这是与脂肪酸和葡萄糖不同的;氨基酸也不能被排泄出去。过量的氨基酸被用作代谢燃料。 $\alpha$ -氨基被去掉,剩下的碳架则转变为主要的代谢中间产物。过量氨基酸的大部分氨基转变成脲,而其碳架则转变为乙酰CoA、乙酰乙酰CoA、丙酮酸或柠檬酸循环的一个中间产物。因此,由氨基酸可以形成脂肪酸、酮体和葡萄糖。

$\alpha$ -氨基通过谷氨酸的氧化性脱氨而转变成铵离子

哺乳类体内氨基酸降解的主要场所是肝脏。我们先讨论 $\alpha$ -氨基的命运,然后再讨论碳架的命运。许多氨基酸的 $\alpha$ -氨基都是转移给 $\alpha$ -酮戊二酸而形成谷氨酸,谷氨酸再发生氧化性脱氨而产生 $\text{NH}_4^+$ 。



转氨酶类催化 $\alpha$ -氨基从 $\alpha$ -氨基酸上转移到 $\alpha$ -酮酸上的反应。这些酶亦称为氨基转移酶。



谷氨酸转氨酶是这些酶中最重要的,它催化氨基转移到 $\alpha$ -酮戊二酸上的反应。

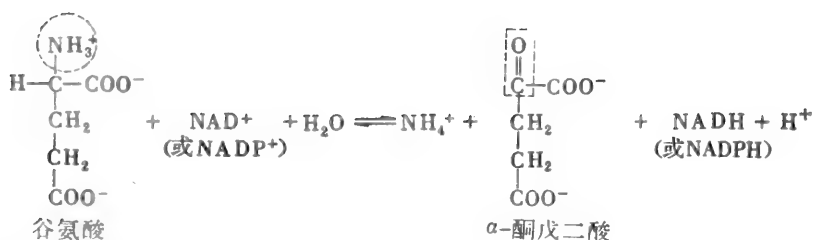


丙氨酸转氨酶也是哺乳动物组织中很多的,它催化氨基转移到丙酮酸上的反应。



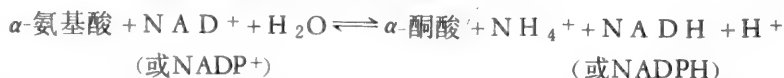
这一步骤中所形成的丙氨酸又能将其氨基转移给 $\alpha$ -酮戊二酸而形成谷氨酸。这两种转氨酶把各种氨基酸的 $\alpha$ -氨基集中到谷氨酸中以转变成 $\text{NH}_4^+$ 。

通过氧化性脱氨由谷氨酸形成铵离子。这一反应是由谷氨酸脱氢酶催化的,此酶是不寻常的,它能够既利用 $\text{NAD}^+$ 又利用 $\text{NADP}^+$ 。



谷氨酸脱氢酶的活性是受到变构调节的。脊椎动物的此种酶由六个完全相同的亚基组成，它们可进一步聚合。鸟三磷（GTP）和腺三磷（ATP）是变构抑制剂，而鸟二磷（GDP）和腺二磷（ADP）是变构活化剂。因此，能荷的降低加速氨基酸的氧化。

由转氨酶和由谷氨酸脱氢酶所催化的反应的总和是：



在陆生脊椎动物体内， $\text{NH}_4^+$ 转变为脲，脲则排出体外。脲的合成即将讨论。

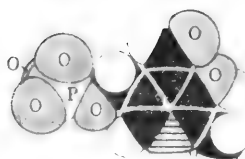
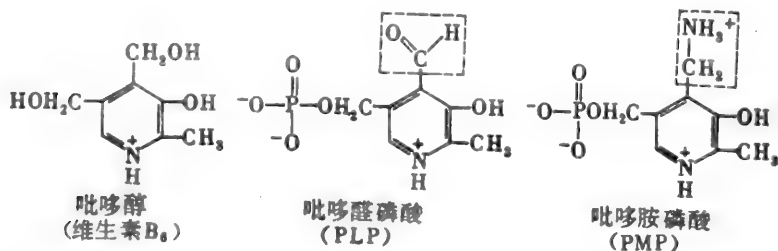


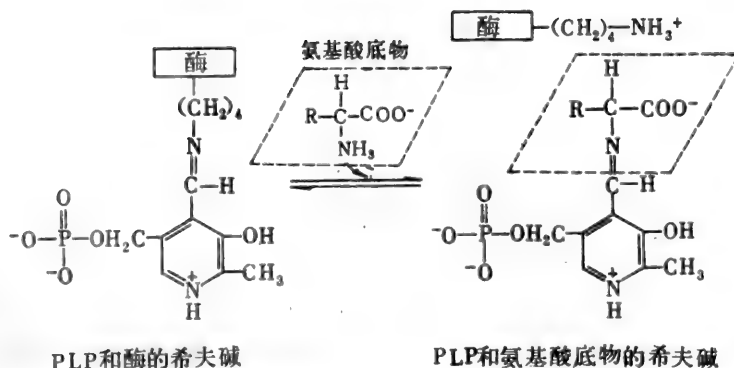
图18-1 吡哆醛磷酸(PLP)的空间填充模型。

### 转氨酶的辅基吡哆醛磷酸形成希夫碱型中间产物

所有转氨酶的辅基都是吡哆醛磷酸(PLP)，它是由吡哆醇（维生素B<sub>6</sub>）衍生而来的。在转氨过程中，吡哆醛磷酸在瞬间转变成吡哆胺磷酸（PMP）（图18-1）。



PLP酶与其底物形成共价的希夫碱型中间产物。在没有底物时，PLP的醛基与活性部位上专门的赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基形成希夫碱的键。氨基酸底物的 $\alpha$ -氨基置换活性部位赖氨酸的 $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ 基。所形成的氨基酸-PLP希夫碱仍以非共价的力牢固地结合在酶上。



此希夫碱和PLP与活性部位赖氨酸之间的碱都是醛亚胺类 (aldimines)。在催化过程中, 氨基酸-PLP希夫碱中的双键移位形成酮亚胺 (ketimine), 然后水解为PMP和 $\alpha$ -酮酸。斯内尔, E. (Esmond Snell) 和布朗斯泰因, A. (Alexander Braunstein) 所提出的反应机理如图18-2所示。活性部位的赖氨酸或另一位置适当的碱性基团大概起着电子坑(sink)的作用而有利于醛亚胺 $\rightarrow$ 酮亚胺的转化。这些步骤组成了总反应的一半。

氨基酸<sub>1</sub> + E-PLP  $\rightleftharpoons$   $\alpha$ -酮酸 + E-PMP  
 总反应的另一半是上述途径的逆转。第二个酮酸与酶-吡哆胺磷酸复合物 (E-PMP) 反应产生第二个氨基酸并再生酶-吡哆醛磷酸复合物 (E-PLP)。  
 $\alpha$ -酮酸<sub>2</sub> + E-PMP  $\rightleftharpoons$  氨基酸<sub>2</sub> + E-PLP  
 这些部分反应的总反应是:

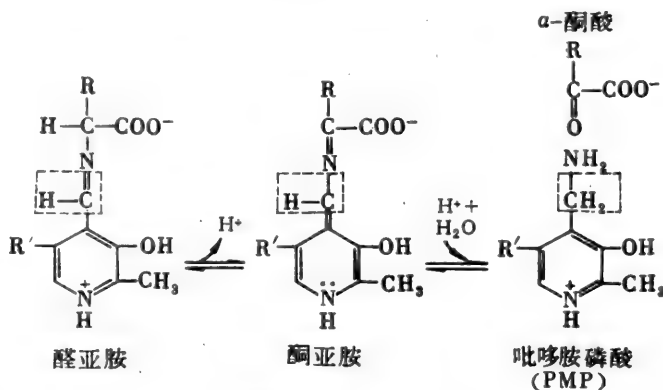


图18-2 转氨反应的假设机理。



PLP 酶催化活性的多种多样性是很突出的。转氨作用仅仅是 PLP 酶所催化的许多种氨基酸转变中的一种。氨基酸的 $\alpha$ -碳原子上发生的其它反应是脱羧反应、脱氨反应、消旋作用和醛醇裂解 (图18-3)。此外, PLP 酶还催化作为底物的氨基酸的 $\beta$ -碳原子 (如色氨酸合

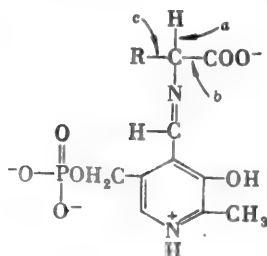
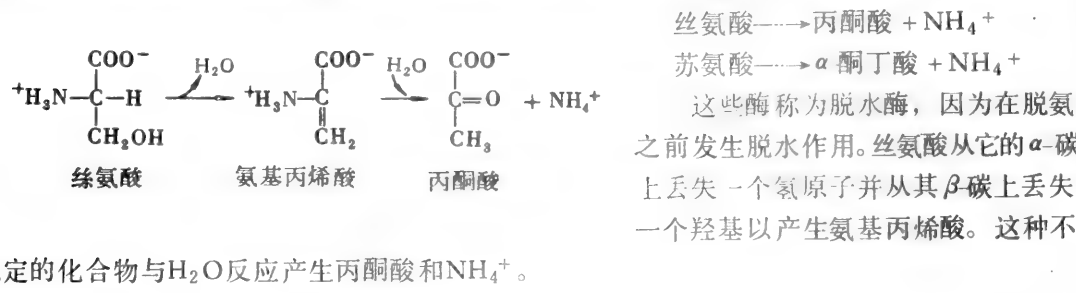


图18-3 吡哆醛磷酸酶类使氨基酸底物的 $\alpha$ -碳原子上的三个键之一变成不稳定的。例如, 转氨酶使键a变得不稳定, 脱羧酶使键b变得不稳定, 醛缩酶 (例如苏氨酸醛缩酶)使键c变得不稳定。PLP酶也催化氨基酸的 $\beta$ -和 $\gamma$ -碳原子上发生的反应。

成酶, 382 页) 和  $\gamma$  碳原子 (如胱硫醚酶, 380 页) 的消除反应和取代反应。这些反应有下列共同的特点。第一, 氨基酸底物 (胺的部分) 和 P L P (羧基部分) 形成希夫碱。第二,  $\sim$  P L P 起着电子坑的作用以使带负电荷的催化的中间产物稳定化。PLP 的环上的氮从氨基酸底物上吸引电子。换句话说, PLP 是亲电子的催化剂。第三, 然后产物希夫碱水解。

### 丝氨酸和苏氨酸能直接脱氨

丝氨酸和苏氨酸的  $\alpha$  氨基能直接转变为  $\text{NH}_4^+$ , 因为这两种氨基酸的侧链中都含有羟基。这些直接的脱氨作用是由丝氨酸脱水酶和苏氨酸脱水酶催化的, P L P 是它们的辅基。



### 大多数陆生脊椎动物体内 $\text{NH}_4^+$ 转变为脲并排出体外

氨基酸分解所形成的一些  $\text{NH}_4^+$  用于含氮化合物的生物合成。在大多数陆生脊椎动物体内, 多余的  $\text{NH}_4^+$  转变为脲然后排出体外。在鸟类和陆生爬虫类体内, 则  $\text{NH}_4^+$  转化为尿酸排泄出去, 而许多水生动物则直接排泄  $\text{NH}_4^+$ 。这三类生物称为排尿的、排尿酸的和排氨的。

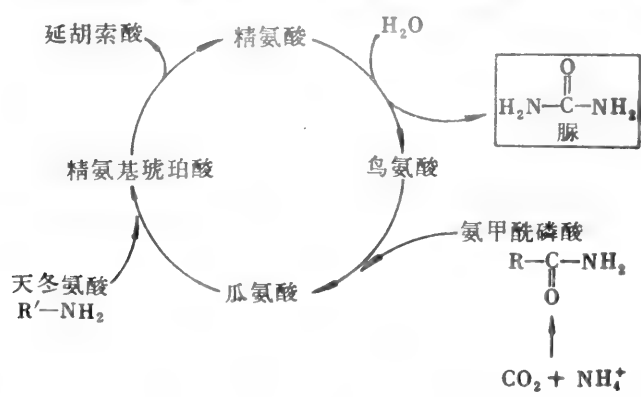
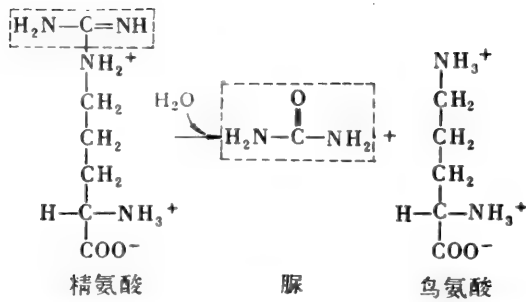


图 18-4 脲循环。

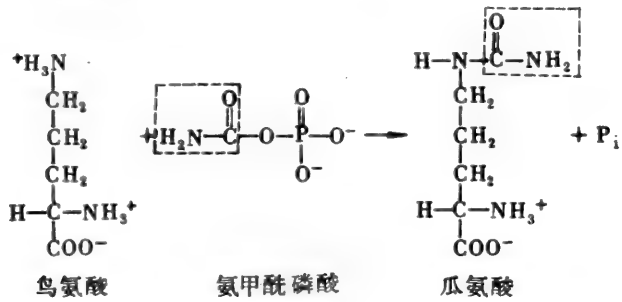
在陆生脊椎动物体内, 脲是由脲循环合成的。这一系列反应是克 雷布斯, H. (Hans Krebs) 和汉斯莱特, K. (Kurt Henseleit) 于 1932 年提出的, 是在阐明柠檬酸循环之前五年。事实上, 脲循环是第一个被发现的环式代谢途径。这一途径所合成的脲中的一个氮原子来自于氨, 而另一个氮原子则来自于天冬氨酸 (图 18-4)。脲的碳原子是由  $\text{CO}_2$  衍生而来的。鸟氨酸为脲循环中这些碳和氮原子的载体。

脲的直接前体是精氨酸, 它被精氨酸酶水解为脲和鸟氨酸

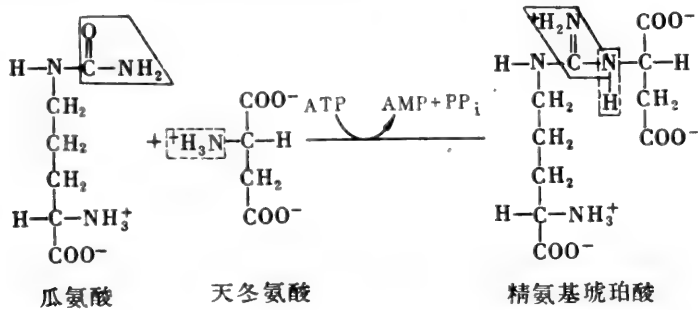




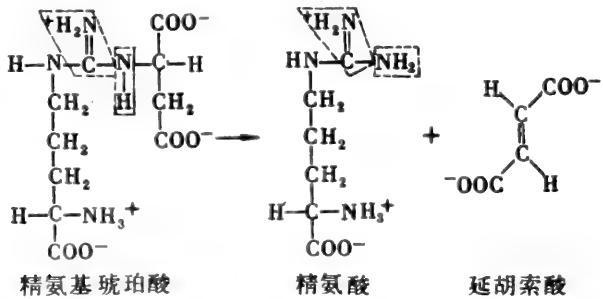
脲循环中其它反应的结果是鸟氨酸合成为精氨酸。首先，氨甲酰基转移到鸟氨酸上，形成瓜氨酸，这是由鸟氨酸转氨甲酰酶催化的反应。这一反应中氨甲酰基的供体是氨甲酰磷酸，由于其中有酐键所以它的转移势高。



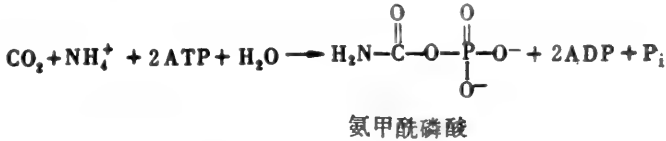
然后精氨基琥珀酸合成酶催化瓜氨酸和天冬氨酸的缩合。推动精氨基琥珀酸合成的是ATP裂解为AMP和焦磷酸以及随后焦磷酸的水解。



最后，精氨基琥珀酸酶将精氨基琥珀酸裂解为精氨酸和延胡索酸。注意，这些反应保留了天冬氨酸的碳架，而将它的氨基转移，形成精氨酸。



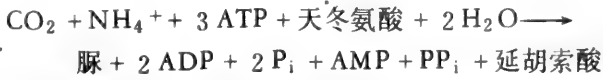
氨甲酰磷酸是由 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{CO}_2$ 、ATP和 $\text{H}_2\text{O}$ 通过一复杂反应合成的，此反应为氨甲酰磷酸合成酶所催化。这种酶的一个不寻常的特点就是需要N-乙酰谷氨酸来活化。



消耗二分子ATP得到氨甲酰磷酸的这一合成反应实质上是不可逆的。

### 脲循环与柠檬酸循环相连

脲合成的化学计算关系为



焦磷酸迅即水解，所以每合成一分子脲要用掉四个高能磷酸键。脲循环合成延胡索酸是重要的，因为它把脲循环和柠檬酸循环

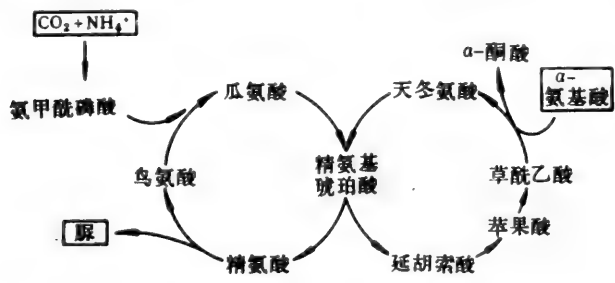


图18-5 脲循环、柠檬酸循环和草酰乙酸的转氨作用由延胡索酸和天冬氨酸联系起来。

的，因为它把脲循环和柠檬酸循环联系起来了（图18-5）。延胡索酸水化为苹果酸，苹果酸又氧化为草酰乙酸。这个关键性的中间产物有几种可能的命运：（1）草酰乙酸能发生转氨作用而成为天冬氨酸；（2）它能通过葡糖异生途径转变为葡萄糖；（3）它能与乙酰CoA缩合形成柠檬酸。

脲循环及其有关反应的区域化也是值得注意的。由谷氨酸脱氢酶形成 $\text{NH}_4^+$ ， $\text{NH}_4^+$ 掺入氨甲酰磷酸以及随后瓜氨酸的合成是在线粒体间质中发生的。与此相反，脲循环的以下三个步骤，即导致脲形成的步骤，却是在细胞溶质中发生的。

### 遗传性的脲循环酶的缺陷引起高氨血

高水平的 $\text{NH}_4^+$ 对人是有毒的。肝脏中脲的合成是除去 $\text{NH}_4^+$ 的主要途径。脲循环的任何一个步骤的完全阻断与生命大概是不能共存的，因为还不知道有什么其它合成脲的途径。已诊断到由于部分阻断脲循环中的任一步骤而引起的遗传性疾病。最常见的是血液中 $\text{NH}_4^+$ 的水平增高（高氨血）。几乎完全缺乏脲循环中的任何一种酶的结果是在出生后不久就昏迷和死亡。部分缺乏这些酶则引起智力发展迟滞、嗜眠症和不时呕吐。低蛋白的饮食会使血液中铵的水平降低，在临床上也能使这些遗传性疾病的较轻微的形式有所缓解。

为什么高水平的 $\text{NH}_4^+$ 有毒呢？一个可能的解释是高浓度的铵离子使



谷氨酸脱氢酶所催化的反应的平衡偏向于谷氨酸的形成，其结果是  $\alpha$ -酮戊二酸缺少。随后  $\text{NH}_4^+$  又与谷氨酸结合形成谷酰胺（373 页），这又使反应进一步推向谷氨酸一侧。柠檬酸循环中间产物  $\alpha$ -酮戊二酸的缺少导致 **ATP** 形成速率的降低。**ATP** 水平的降低使脑高度损伤。

已降解的氨基酸中碳原子的命运

到此为止，我们已讨论了从氨基酸上除去氨基并使之转变为脲的一系列反应。现在我们来讨论剩下的碳架的命运（图18-6）。氨基酸降解的方针是形成主要代谢中间产物而它们又能转变为葡萄糖或被柠檬酸循环氧化。事实上，分属各组的二十种氨基酸的碳架都集中成仅仅七种分子：丙酮酸、乙酰CoA、乙酰乙酰CoA、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酰CoA、延胡索酸和草酰乙酸。我们在这里又看到代谢转化十分经济的另一个例子。

降解为乙酰CoA或乙酰乙酰CoA的氨基酸称为生酮的，因为它们产生酮体。反之，降解为丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酰CoA、延胡索酸或草酰乙酸的氨基酸称为生葡萄糖的。由这些氨基酸得到葡萄糖的净合成是可能的，因为这些柠檬酸循环的中间产物和丙酮酸能转变为磷酸烯醇式丙酮酸，然后转变为葡萄糖（265 页）。想一想，哺乳类没有由乙酰CoA和乙酰乙酰CoA净合成葡萄糖的途径。

在二十种基本的氨基酸中，只有亮氨酸纯粹是生酮的。异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸既是生酮的又是生葡萄糖的。它们的一些碳原子出现在乙酰CoA或乙酰乙酰CoA中，而其它碳原子则出现在葡萄糖的潜在前体中。其它十四种氨基酸纯粹是生葡萄糖的。

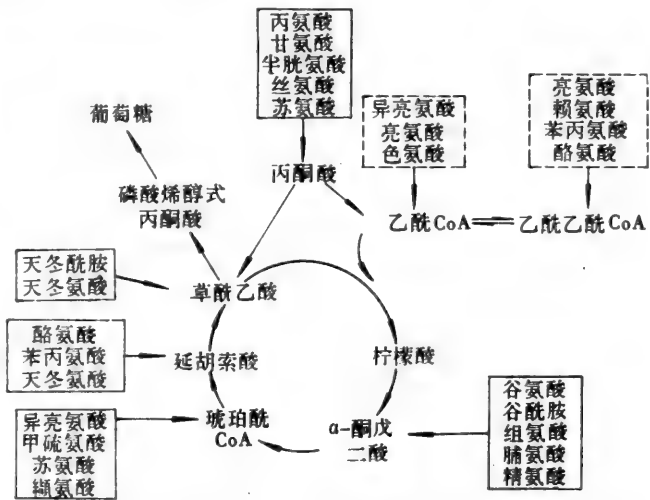


图18-6 氨基酸碳架的命运。生葡萄糖的氨基酸用实线框示，生酮的氨基酸用虚线框示。

C<sub>3</sub> 族：丙氨酸、丝氨酸和半胱氨酸转变为丙酮酸

三碳氨基酸丙氨酸、丝氨酸和半胱氨酸的入口处是丙酮酸（图18-7）。丙氨酸的转氨作用直接产生丙酮酸：



如前所述（312 页），谷氨酸然后发生氧化性脱氨，产生  $\text{NH}_4^+$  并再生  $\alpha$ -酮戊二酸。这些反应的总和是：



氨基酸降解中的另一个简单的反应是丝氨酸由丝氨酸脱水酶（314 页）脱氨而形成丙酮酸。



半胱氨酸可以通过几种途径转变为丙酮酸，其硫原子则出现在 $\text{H}_2\text{S}$ ， $\text{SO}_3^{2-}$ 或 $\text{SCN}^-$ 中。

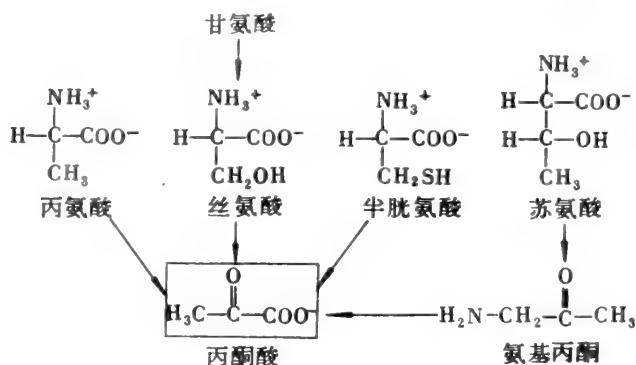


图18-7 丙酮酸是丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和苏氨酸的入口点。

另外两种氨基酸的碳原子也能转变为丙酮酸。甘氨酸能通过一个羟甲基的酶促加成而转变为丝氨酸（376页）。苏氨酸能通过氨基丙酮而产生丙酮酸。

### C<sub>4</sub> 族：天冬氨酸和天冬酰胺转变为草酰乙酸

四碳氨基酸天冬氨酸直接转氨为草酰乙酸——柠檬酸循环的中间产物；



天冬酰胺则被天冬酰胺酶水解为 $\text{NH}_4^+$ 和天冬氨酸，后者再发生转氨作用。

回忆一下，天冬氨酸也能由尿素循环转变为延胡索酸（316页）。延胡索酸也是酪氨酸和苯丙氨酸的一半碳原子的入口点，不久就将讨论到。

### C<sub>5</sub> 族：几种氨基酸通过谷氨酸转变为 $\alpha$ -酮戊二酸

几种五碳氨基酸的碳架在 $\alpha$ -酮戊二酸处进入柠檬酸循环。这些氨基酸转变为谷氨酸，后者再由谷氨酸脱氢酶氧化脱氨为 $\alpha$ -酮戊二酸（图18-8）。

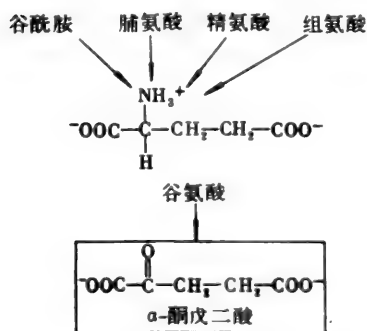


图18-8  $\alpha$ -酮戊二酸是几种C<sub>5</sub>氨基酸的入口点，它们先变成谷氨酸。

组氨酸转变为4-咪唑酮5-丙酸（图18-9）。这一中间产物的环中的酰胺键水解为谷氨酸的N-亚胺甲基衍生物，它再将其亚胺甲基转移给四氢叶酸而本身转变为谷氨酸，四氢叶酸是活化的一碳单位的载体（见377页）。

谷酰胺被谷酰胺酶水解为谷氨酸和 $\text{NH}_4^+$ 。脯氨酸和精氨酸则转变为谷氨酸 $\gamma$ -半醛，后者再氧化为谷氨酸（图18-10）。

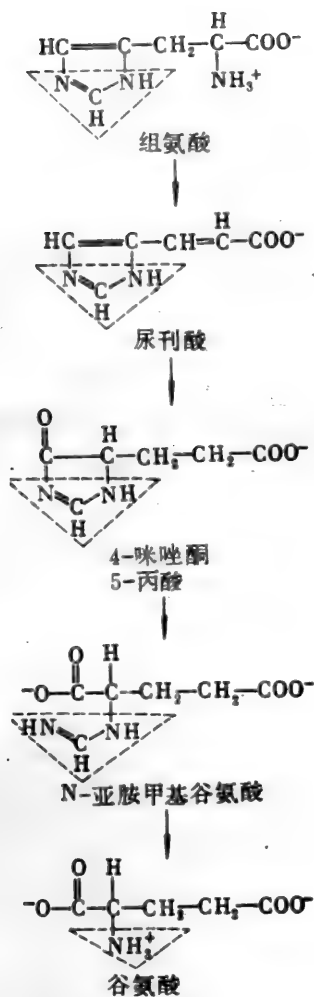


图18-9 组氨酸转变为谷氨酸。

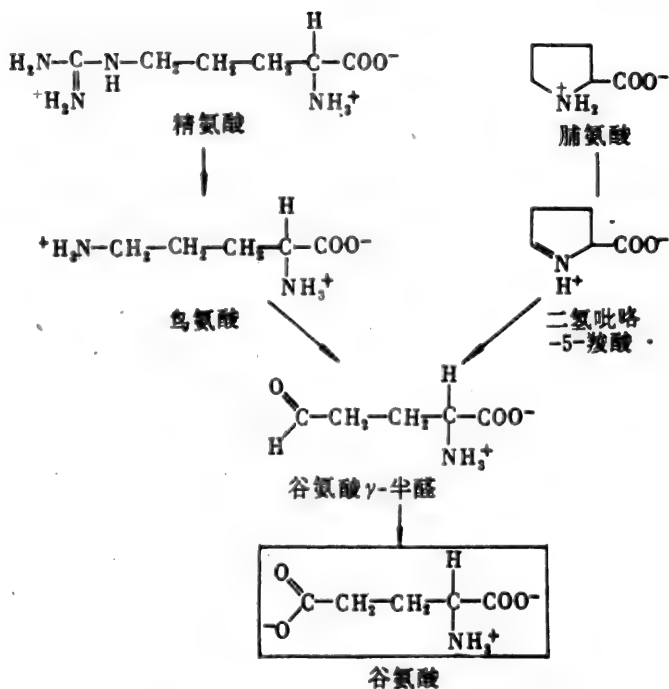


图18-10 脯氨酸和精氨酸转变为谷氨酸。

### 琥珀酰辅酶A 是某些氨基酸的入口处

琥珀酰CoA是甲硫氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和缬氨酸的某些碳原子的入口处。甲基丙二酰CoA是这四种氨基酸分解的中间产物(图18-11)。

从丙酰CoA到琥珀酰CoA的途径是特别有趣的。丙酰CoA消耗一个ATP而羧化为甲基丙二酰CoA的D-异构体。这一羧化反应是由丙酰CoA羧化酶催化的,它是一种生物素酶,其催化的机理与乙酰CoA羧化酶和丙酮酸羧化酶的类似。甲

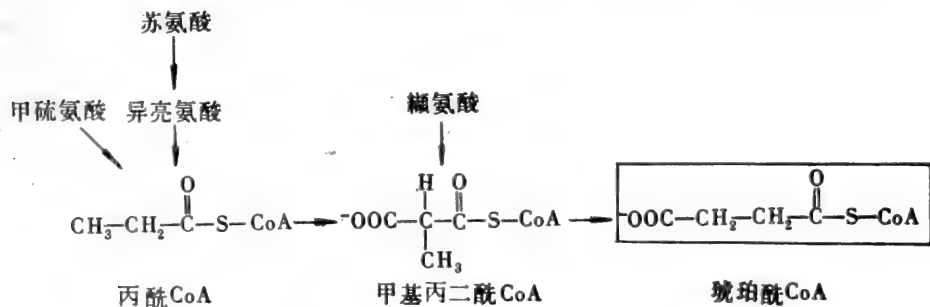
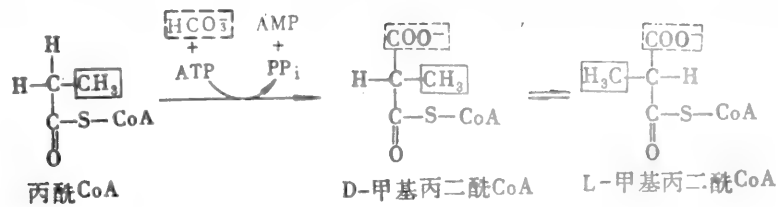
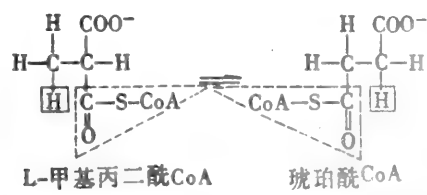


图18-11 甲硫氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和缬氨酸转变为琥珀酰CoA。

基丙二酰CoA的D-异构体消旋化为L-异构体，这就是把它转变为琥珀酰CoA的变位酶的底物。



琥珀酰CoA是由L-甲基丙二酰CoA通过分子内重排而形成的。-CO-S-CoA基团从C-2移到C-3而与一个氢原子交换。这种非常不寻常的异构化作用是由甲基丙二酰CoA变位酶催化的，这是哺乳动物体内已知的含有维生素B<sub>12</sub>衍生物作为辅酶的两种酶中的一种。



这种从丙酰CoA到琥珀酰CoA的途径也参与具有奇数碳原子脂肪酸的氧化。奇数碳的酰基CoA最后发生硫解作用而裂解时产生乙酰CoA和丙酰CoA（299页）。

### 钴胺素（维生素B<sub>12</sub>）酶催化重排反应和甲基化反应

自从1926年迈诺特，G.（George Minot）和墨菲，W.（William Murphy）发现恶性贫血症可因病人食用大量的肝而治愈以来钴胺素（维生素B<sub>12</sub>）就成了生物化学和医药中一个

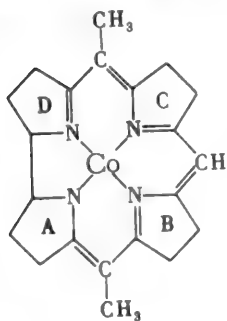


图18-12 钴胺素的咕啉核心。此略图中未画出吡咯上的取代基和钴上的另外两个配位基。

个争论的问题。霍奇金，D.（Dorothy Hodgkin）于1948年提纯并结晶了钴胺素，又于1956年阐明了其复杂的三维结构。钴胺素的核心是带有一个中心钴原子的咕啉环（图18-12）。咕啉环和卟啉环类似，有四个吡咯单位。其中两个（A环和D环）是彼此直接成键的，而另外两个则由次甲基桥连起来，象卟啉环中一样。吡咯环上的取代基为甲基、丙酰胺基和乙酰胺基。

一个钴原子与四个吡咯的氮成键。第五个取代基（图18-13中咕啉平面的下边）为二甲苯并咪唑的衍生物，它含有核糖3-磷酸和氨基异丙醇。二甲苯并咪唑的一个氮原子与钴相连。氨基异丙醇的氨基与D环的侧链形成酰胺键。钴原子上的第六个取代基（图18-13中咕啉环平面的上边）可能是C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-N<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>，OH<sup>-</sup>或脱氧腺苷。这种维生素的最常见的商品形式是氰钴胺素，在它的第六个配价位置上，有一个氰化物离子存在，此离子来自分离

过程 (图18-14)。在体内并无氰化物离子与钴胺素结合。

钴胺素中的钴原子可能为 + 1, + 2或+ 3的氧化状态。在羟钴胺素 (OH<sup>-</sup>占据第六个配

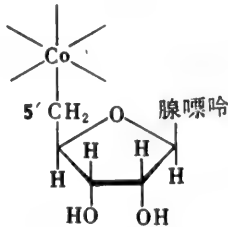


图18-14 在5'-脱氧腺苷钴胺素中5'-脱氧腺苷的5'-碳与钴原子成键。这是生物分子中唯一已知的碳—金属键的例子。

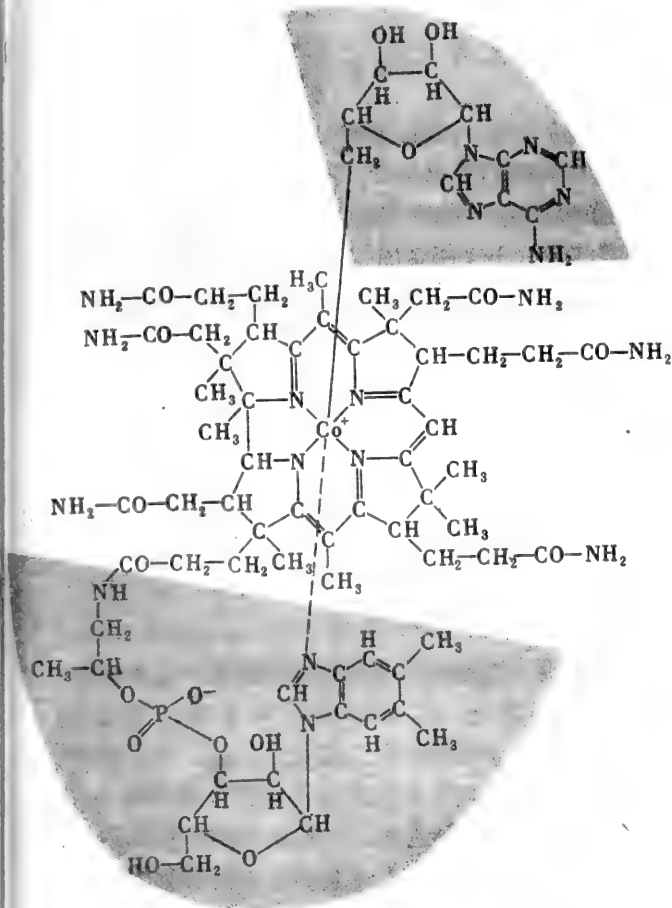


图18-13 5'-脱氧腺苷钴胺素的结构。

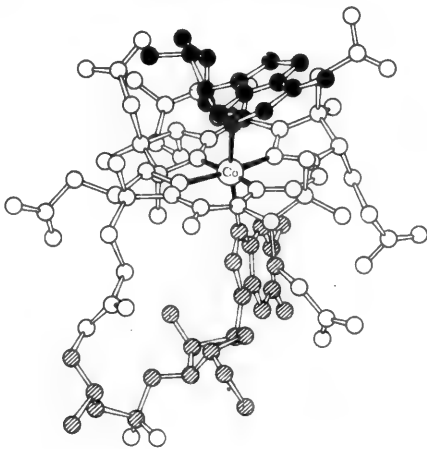


图18-15 5'-脱氧腺苷钴胺素的模型。中心为钴原子,无色球为咕啉单位,上部的黑球为脱氧腺苷单位,下部的斜线球为苯并咪唑单位。

位部位) 中钴原子为 + 3 状态。这种形式称为B<sub>12a</sub> (Co<sup>3+</sup>), 它可由一种黄素蛋白还原酶还原为二价的状态, 称为B<sub>12r</sub> (Co<sup>2+</sup>)。B<sub>12r</sub> (Co<sup>2+</sup>) 的形式又可被第二种黄素蛋白还原酶还原为B<sub>12s</sub> (Co<sup>+</sup>)。在这两种还原反应中NADH都是还原剂。B<sub>12s</sub>这一形式是产生有活性的辅酶的最终酶促反应的底物。5'-脱氧腺苷基从ATP上转移到维生素B<sub>12s</sub> (Co<sup>+</sup>) 上, 形成5'-脱氧腺苷钴胺素, 它就是甲基丙二酰CoA变位酶的辅酶 (图18-15)。



5'-脱氧腺苷钴胺素

钴胺素酶类催化两种类型的反应: (1)重排, 例如L-甲基丙二酰CoA转变为琥珀酰CoA; (2)甲基化反应, 如甲硫氨酸的合



图18-16 钴胺素酶催化的重排反应。R 基团可能是氨基、羟基或一个带取代基的碳。

成 (380 页)。重排反应是连接在两个相邻的碳原子上的两个基团的互换 (图18-16)。一个氢原子从一个碳原子上移到第二个碳原子上去, 而R 基团同时以相反的方向移过来。在这种分子内的重排反应中, 5'-脱氧腺苷钴胺素的碳-钴键断开。底物上丢掉氢原子的那个碳原子在瞬间与钴成键。

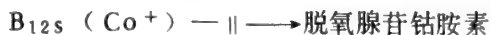
### 在恶性贫血中钴胺素的吸收受阻

钴胺素的吸收有一种特殊的转运系统。胃分泌一种称为内源因素的糖蛋白, 它在小肠腔中与钴胺素结合。随后这一复合物又与回肠内壁中特殊的受体结合。然后钴胺素与内源因素的复合物被一种释放因子解离, 而被主动转运通过回肠壁的膜并进入血流中。恶性贫血是由于缺乏内源因素引起的, 其结果是钴胺素的吸收受阻。这种疾病原来的治疗方法是让病人吃大量的肝, 钴胺素的最丰富的来源, 所以即使在没有内源因素的情况下也能吸收足够的这种维生素。最可靠的疗法是每月肌肉注射一次钴胺素。

动物和植物都不能合成钴胺素。这种维生素的独特之处是, 好象只能被微生物合成, 特别是厌氧的细菌。正常人每天需要10  $\mu\text{g}$  以下的钴胺素。钴胺素的营养性缺乏很少见, 因为实际上在所有动物的组织中都有这种维生素。

### 已知几种甲基丙二酰辅酶A 代谢的遗传性缺陷

近年来已鉴定出几种甲基丙二酰CoA代谢的遗传性紊乱。通常在新生的第一年内这种紊乱就变得明显, 突出的症状是酸中毒。动脉血的pH 约为7.0, 而不是正常值7.4。有这种紊乱的患者的尿中有大量的甲基丙二酸。正常人每天排泄的甲基丙二酸少于5 mg, 而甲基丙二酰CoA 代谢有缺陷的病人可能排泄1 g 或更多。当以大剂量的钴胺素不经肠道施用, 大约有一半患甲基丙二酸的酸尿的患者可得到显著的好转。动脉血的pH 恢复正常, 甲基丙二酸的排泄显著减少。能发生这些反应的病人通常是在催化脱氧腺苷钴胺素合成的转移酶方面有缺陷:

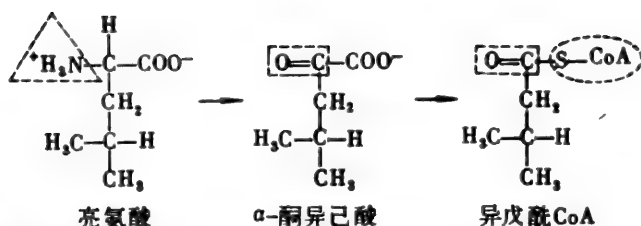


反之, 其它一些甲基丙二酰CoA代谢有缺陷的病人大剂量的钴胺素没有反应。其中的一些人可能在甲基丙二酰CoA变位酶的脱辅基酶蛋白上有缺陷。这种形式的甲基丙二酸的酸尿常是致死的。

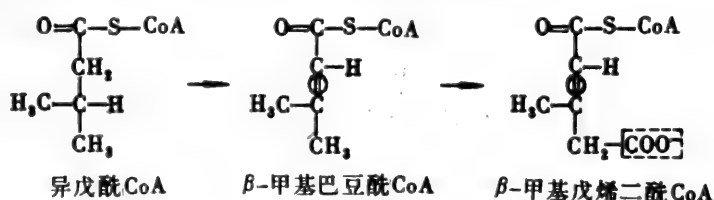
### 亮氨酸降解为乙酰CoA和乙酰乙酰CoA

如前所述, 在基本的二十种氨基酸中, 只有亮氨酸是纯粹生酮的。它是由我们已在脂肪酸降解和柠檬酸循环中遇到过的反应降解的。首先, 亮氨酸经转氨作用变为相应的 $\alpha$ -酮酸—— $\alpha$ -酮异己酸。这种 $\alpha$ -酮酸再发生氧化性脱羧成异戊酰CoA。这一反应与丙酮酸氧化脱羧为乙酰CoA和 $\alpha$ -酮戊二酸变为琥珀酰CoA类似。

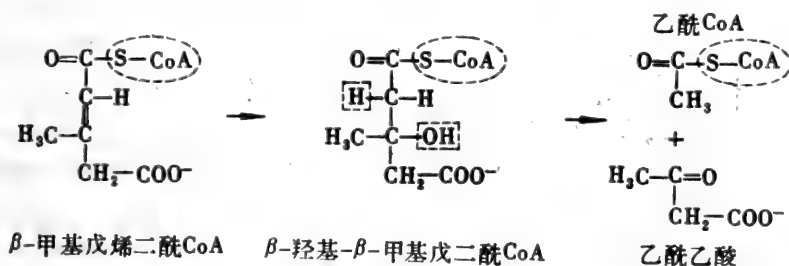




异戊酰CoA脱氢产生β-甲基巴豆酰CoA。这一氧化反应是由异戊酰CoA脱氢酶催化的，此酶中氢受体为FAD，与乙酰CoA脱氢酶所催化的脂肪酸氧化中的类似反应中一样。β-甲基巴豆酰CoA消耗一个ATP而羧化，形成β-甲基戊烯二酰CoA。如所预料，β-甲基巴豆酰CoA羧化酶的羧化机理与丙酮酸羧化酶和乙酰CoA羧化酶的羧化机理类似。事实上，我们目前关于依赖于生物素的羧化反应机理的许多知识是来自于林楠关于这种酶的开拓性工作的。



然后β-甲基戊烯二酰CoA被水化，形成β-羟基-β-甲基戊二酰CoA，它再裂解为乙酰CoA和乙酰乙酸。在讨论由脂肪酸形成酮体时已讨论过这一反应（300页）。



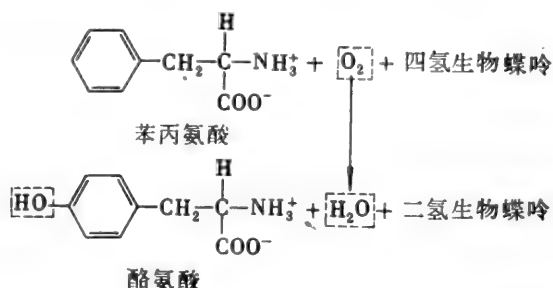
值得注意的是许多辅酶参与亮氨酸降解为乙酰CoA和乙酰乙酸的反应：转氨作用中有PLP；氧化性脱羧中有TPP，硫辛酸，FAD和NAD<sup>+</sup>；脱氢作用中又有FAD；还有羧化作用中的生物素。辅酶A是这些反应中的酰基载体。

缬氨酸和异亮氨酸的降解途径与亮氨酸的类似。所有这三种氨基酸都是先发生转氨作用，形成相应的α-酮酸，酮酸再进行氧化性脱羧，产生CoA的衍生物。随后的反应就和脂肪酸氧化的反应一样。异亮氨酸产生乙酰CoA和丙酰CoA，而缬氨酸产生甲基丙二酰CoA。有一种先天性的代谢上的缺陷影响缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的降解。枫糖尿症（maple syrup urine disease）中，这三种氨基酸的氧化性脱羧被阻断。血和尿中亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的量显著增高，其结果是由这些氨基酸衍生的α-酮酸的相应增多。这种病的患者的尿有枫糖浆的气味，这就是病名的由来。除非患者在初龄时就用缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸含

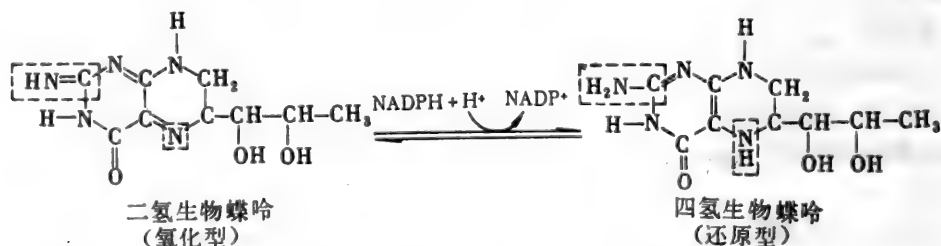
量低的饮食，否则糖糖尿病常是致死的。

## 苯丙氨酸和酪氨酸被加氧酶降解为 乙酰乙酸和延胡索酸

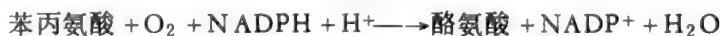
苯丙氨酸和酪氨酸降解的途径有一些很有趣的特点。这一系列反应表明分子态氧是如何用来破坏芳香环的。第一步是苯丙氨酸羟基化为酪氨酸，是由苯丙氨酸羟化酶催化的反应。这种酶称为单加氧酶 (monooxygenase) 或称混合功能加氧酶，因为  $O_2$  的一个原子出现在产物中而另一个原子出现在  $H_2O$  中。



这里的还原剂是四氢生物蝶呤，一种以前尚未讨论到的电子载体。这种电子载体的氧化型是二氢生物蝶呤。



NADPH 还原二氢生物蝶呤，再生四氢生物蝶呤，此反应由二氢生物蝶呤还原酶所催化。苯丙氨酸羟化酶和二氢生物蝶呤还原酶所催化的反应的总和是：



下一步是酪氨酸发生转氨作用，变成对-羟苯丙酮酸 (图18-17)。这种  $\alpha$ -酮酸然后与  $O_2$  反应形成尿黑酸。催化这一复杂反应的酶是对-羟苯丙酮酸羟化酶，它称为双加氧酶，因为  $O_2$  中的两个原子都掺入到产物中去。然后尿黑酸的芳香环被  $O_2$  裂解，产生 4-顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸。这一反应是由另一种双加氧酶尿黑酸氧化酶催化的。事实上，生物体系中几乎芳香环的所有裂解反应都是由双加氧酶催化的，双加氧酶是一类由早石修，O. (Osamu Hayashi) 发现的酶。4-顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸然后异构化为 4-延胡索酰乙酰乙酸，它最后水解为延胡索酸和乙酰乙酸。

加罗德关于代谢的先天性缺陷的发现

尿黑酸尿是由于没有尿黑酸氧化酶而引起的一种遗传性的代谢紊乱。尿黑酸积累起来并在尿中排出，放置后尿变黑，因为尿黑酸被氧化并聚合成类似黑色素的物质。正如鲁西谭努斯，Z. (Zacutus Lusitanus) 于1649年所描述的，尿黑酸尿是一种比较良性的情况：

病人是一个男孩，他排泄黑色的尿。他在十四岁的时候接受了烈性药物的疗程，其目的是克服他的内脏的剧热，据信是这种剧热使他的胆汁变焦变黑，因而引起这种疾病。处方中的疗法有放血、通便、洗浴、冷的流食和许多药物。这些疗法没有一种有明显的效果，最后患者疲于这些无效的和多余的治疗，便决定听其自然。没有发生任何一件预料中的灾难，他结婚了，生了一大家人，而且健康长寿，但总是排泄黑得像墨汁一样的尿。

1902年，加罗德，A. (Archibald Garrod) 证明尿黑酸尿是以单独的孟德尔隐性途径传递的。其次，他认识到尿黑酸是苯丙氨酸和酪氨酸降解的一种正常的中间产物，它所以在尿黑酸尿中积累是因为其降解被阻断。他的结论是“正常代谢中苯环的分裂是一种特殊的酶的作用，而在先天的尿黑酸尿中这种酶是缺少的。”加罗德觉察到基因和酶之间的直接关系，并且认识到化学个性 (chemical individuality) 的重要性。他著的书《代谢的先天性缺陷》 (Inborn Errors of Metabolism) 是最富有想像力的并且是对生物学和医学的重要贡献。

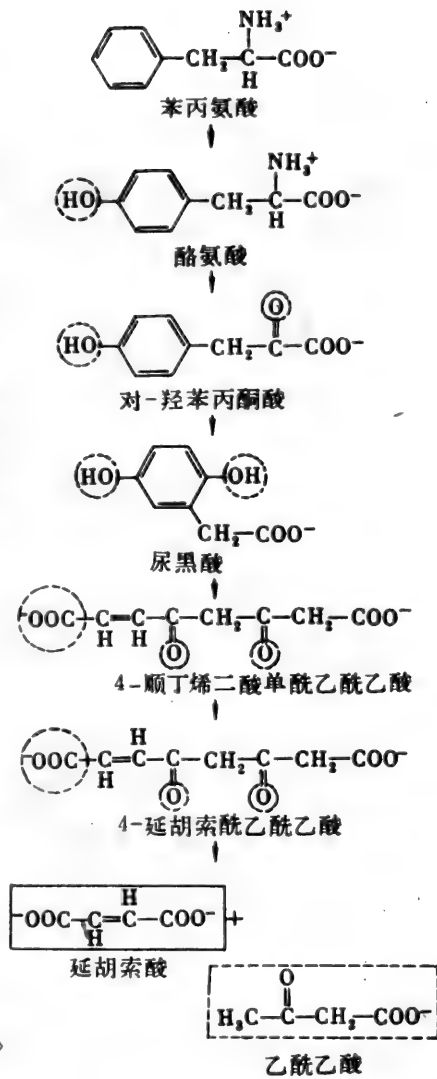
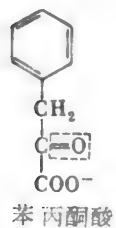


图18-17 苯丙氨酸和酪氨酸降解的途径。

苯丙氨酸羟化作用的阻断导致严重的智力发展迟滞

苯丙酮尿是一种先天性的苯丙氨酸代谢的缺陷，它与尿黑酸尿不同，可能有严重的影响。患苯丙酮尿的人不经治疗几乎总是在智力发育上严重迟滞。事实上，精神病院中的病人约有1%有苯丙酮尿。这些病人的脑重量低于正常，他们的神经鞘化 (myelination) 不完全，而且他们的反射过分活跃。未经治疗的苯丙酮尿患者的估计寿命短得很，一半在二十岁以前死亡，四分之三在三十岁以前死亡。



苯丙酮尿是由于没有或缺少苯丙氨酸羟化酶而引起的，或者更少见的是由于缺乏其四氢生物蝶呤辅助因子而引起的。苯丙氨酸不能转

变为酪氨酸，因而所有体液中均积累苯丙氨酸。在正常人体内其量微不足道的一些苯丙氨酸的变化在苯丙酮尿患者体内变得很突出。这些变化中最明显的是苯丙氨酸发生转氨作用形成**苯丙酮酸**。这种病之所以得名就是因为尿中这种苯丙酮的水平高。苯乳酸、苯乙酸和邻羟基苯乙酸都是由苯丙酮酸衍生而来的。谷酰胺的 $\alpha$ 氨基与苯乙酸的羧基形成酰胺键，从而产生苯乙酰基谷酰胺。

还有许多种其它的与苯丙酮尿有关的氨基酸代谢紊乱，特别是在芳香族化合物方面。苯丙酮尿患者比他们的兄弟姐妹皮肤和毛发的颜色较浅。酪氨酸的羟基化是形成黑素这种色素的第一步。苯丙酮尿患者的这一反应被高水平的苯丙氨酸所竞争性地抑制，因而形成的黑素较少。未经治疗的苯丙酮尿患者智力发育迟滞的生化基础仍是一个谜。

苯丙酮尿患者初生时看上去是正常的，但若不经治疗到一周岁之前就会有严重的缺陷。苯丙酮尿的疗法就是低苯丙氨酸的饮食。其目的是提供恰恰足以满足生长和代谢所需要的苯丙氨酸。将原来苯丙氨酸含量就低的蛋白质，例如奶中的酪蛋白进行水解并用吸附法除去苯丙氨酸。必须在出生后不久就开始用低苯丙氨酸的饮食以防止对脑的不可逆的伤害。在一项研究中，出生后数周内就治疗的苯丙酮尿患者的平均智商 I.Q. 为93；而在一岁时开始治疗的同胞的对照组的平均 I.Q. 为53。

苯丙酮尿的早期诊断是必要的，并且已经通过大规模的普查做到了。过去是向新生儿的尿中加入 $\text{FeCl}_3$ ，在苯丙酮酸存在下这会产生橄榄绿色。现在更可取的诊断指标是血液中苯丙氨酸的水平，因为这更可靠。出现苯丙酮尿的频率大约是20,000新生儿中有一个。这种疾病是常染色体隐性遗传的。在一典型群体中出现约1.5%的杂合子似乎是正常的。带有苯丙酮尿基因的人其苯丙氨酸羟化酶水平较低，其血液中苯丙氨酸水平高就反映了这一点。然而，这些指标都不是绝对的，因为带有这种基因的人和正常人血液中苯丙氨酸的水平有些重叠。测量静脉注射的苯丙氨酸消失的动力学对于带有这种基因的人倒是一种更为确切的检验方法。应该注意孕妇血液中苯丙氨酸水平高可能使胎儿发育不正常。这是分子水平上母亲-婴儿关系的一个突出的例子。

## 概 要

多余的氨基酸用作代谢的燃料。大部分多余氨基酸的降解始于其转氨作用，即将其 $\alpha$ -氨基转移给一个 $\alpha$ -酮酸。吡哆醛磷酸是所有转氨酶的辅酶。 $\alpha$ -氨基都集中到 $\alpha$ -酮戊二酸上形成谷氨酸，谷氨酸脱氢酶再使之发生氧化性脱氨，产生 $\text{NH}_4^+$ 和 $\alpha$ -酮戊二酸。这一反应中， $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 是电子受体。在陆生脊椎动物中， $\text{NH}_4^+$ 被尿循环转变为尿。尿是由精氨酸的水解形成的。尿循环的下一步反应是由鸟氨酸合成精氨酸，鸟氨酸是上述水解反应的另一产物。首先，鸟氨酸被氨甲酰磷酸氨甲酰化为瓜氨酸。然后瓜氨酸与天冬氨酸缩合，形成精氨基琥珀酸，它又裂解为精氨酸和延胡索酸。尿的碳原子和一个氮原子来自于氨甲酰磷酸，

---

黑素(melanin)——皮肤和毛发中的一种黑色的色素：来自希腊字 melan，意即黑。这种聚合的色素是在称为黑素体的颗粒内形成的，这种颗粒中酪氨酸酶(一种单加氧酶)很多。

自然在任何场合都不惯于公开她的秘密，而是在常规之外显露蛛丝马迹：通过仔细研究少见病以专心致力于发现自然的正常规律，这是再好不过的促进医学正确实践的途径。

威廉·哈维(1657)

它是由  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  和 ATP 合成的。脲的另一个氮原子来自于天冬氨酸。每合成一分子脲消耗四个高能磷酸键。

已降解的氨基酸的碳原子转变为丙酮酸、乙酰 CoA、乙酰乙酸或柠檬酸循环的一种中间产物。大多数氨基酸都是纯粹的生葡萄糖的，只有一种是纯粹的生酮的，有少数几种既是生酮的又是生葡萄糖的。丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和苏氨酸降解为丙酮酸。天冬酰胺和天冬氨酸转变为草酰乙酸。 $\alpha$ -酮戊二酸是谷氨酸和四种能转变为谷氨酸的氨基酸（谷氨酰胺、组氨酸、脯氨酸和精氨酸）的入口点。琥珀酰 CoA 是通过甲基丙二酰 CoA 而降解的四种氨基酸（甲硫氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和缬氨酸）的某些碳原子的入口点。脱氧腺苷钴胺素，即维生素  $\text{B}_{12}$  的衍生物，是甲基丙二酰 CoA 异构化为琥珀酰 CoA 所必需的。亮氨酸降解为乙酰乙酰 CoA 和乙酰 CoA。酪氨酸和苯丙氨酸的芳香环是由加氧酶降解的。苯丙氨酸羟化酶，一种单加氧酶，利用四氢生物蝶呤为还原剂。苯丙氨酸和酪氨酸的某些碳原子转变为延胡索酸，而其它一些碳原子则出现在乙酰乙酸中。

## 习 题

1. 写出下列各氨基酸转氨后所形成的  $\alpha$ -酮酸的名字：

- |          |          |
|----------|----------|
| (a) 丙氨酸  | (b) 天冬氨酸 |
| (c) 谷氨酸  | (d) 亮氨酸  |
| (e) 苯丙氨酸 | (f) 酪氨酸  |

2. 写出天冬氨酸通过草酰乙酸转变为葡萄糖的平衡方程式。写出参与这些步骤的辅酶。

3. 写出天冬氨酸通过延胡索酸转变为草酰乙酸的平衡方程式。

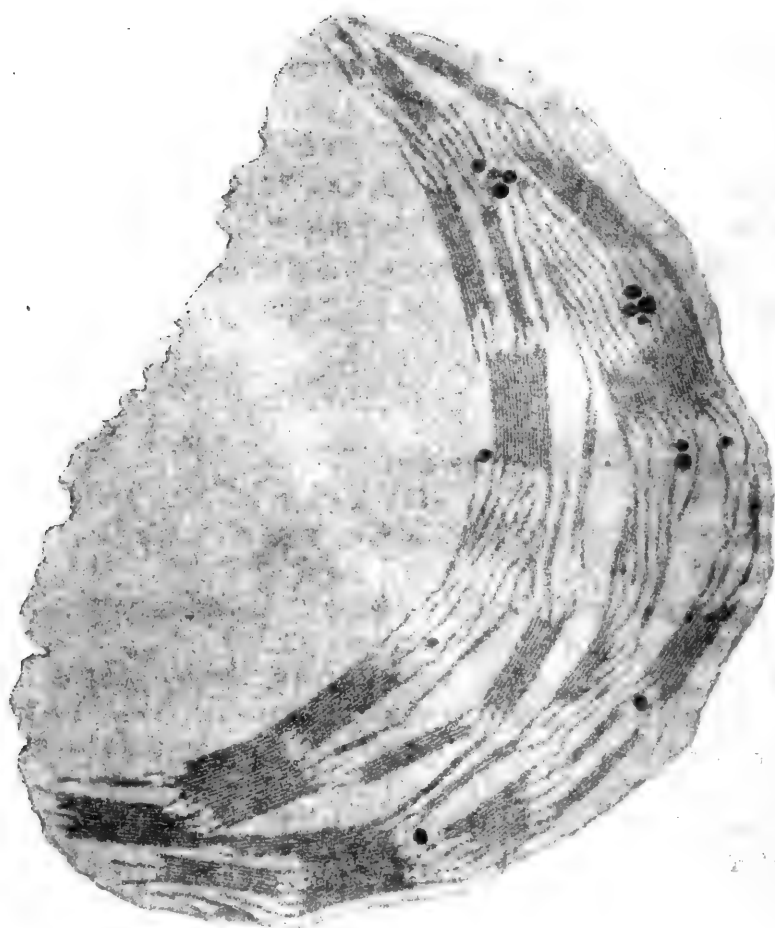
4. 考虑 L-甲基丙二酰 CoA 被 L-甲基丙二酰 CoA 变位酶转变为琥珀酰 CoA 的机理。

(a) 设计一个实验以区别这一反应中  $\text{COO}^-$  基团的移动与  $-\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$  基团的移动。

(b) 事实上，移动的是  $-\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$  基团。现在，设计一个实验以区别  $-\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$  基团的分子内移动和分子间移动。

(c) 当变位酶反应在氘化的水中发生时，氘不掺入琥珀酰 CoA。这一发现的意义何在？

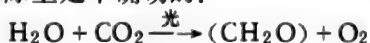
5. 吡哆醛磷酸起着电子坑的作用，所以能使负碳离子的中间产物稳定化。还有什么别的辅基也以这种方式催化反应？



得自菠菜叶子的整个叶绿体的电镜照片。[蒙Dr. Kenneth Miller特许。]

## 第19章 光 合 作 用

生物体系所消耗的自由能均来自太阳能，太阳能则是通过光合作用捕获的。光合作用的基本方程式很简单——但这实际上是不确切的：



这一方程式中 $(\text{CH}_2\text{O})$ 代表碳水化合物。光合作用的机理很复杂，它需要许多种大分子和小分子的相互作用。绿色植物的光合作用发生在叶绿体中，这是一种特化的细胞器。能量转化的器官是叶绿体中类囊体膜系统的一个完整的部分（图19-1）。光合作用的第一步是叶绿素分子吸收光。能量从一个叶绿素分子传到另一个叶绿素分子，最终到达位于所谓作用中心的一个特殊的叶绿素分子上。在两种作用中心上光能被转变为化学上有用的能。实际上，光合作用需要两个光反应的合作。其中一个光反应称为光系统I，它产生NADPH形式的还原能力；另一个称为光系统II，它使水裂解产生 $\text{O}_2$ 并生成一种还原剂。当氧被释放时而且电子流经一个把两个光系统联系起来的电子传递链时，就产生了一种横跨类囊体膜的质子梯度。这一质子梯度推动ATP的合成，和在氧化磷酸化中一样。也可能产生ATP而不同时形成NADPH。

光所产生的NADPH和ATP随后用于把 $\text{CO}_2$ 还原为碳水化合物，这是通过称为卡尔文(Calvin)循环的一系列暗反应而发生的。这些反应存在于叶绿体的可溶性组分中。第一步是 $\text{CO}_2$ 与核酮糖二磷酸形成两分子3-磷酸甘油酸的反应。3-磷酸甘油酸通过葡糖异生途径而形成六碳糖，核酮糖二磷酸则通过转酮醇酶、醛缩酶和几种其它酶的作用而再生出来。循环每转一圈，3ATP和2NADPH就把 $\text{CO}_2$ 还原到六碳糖磷酸的水平。

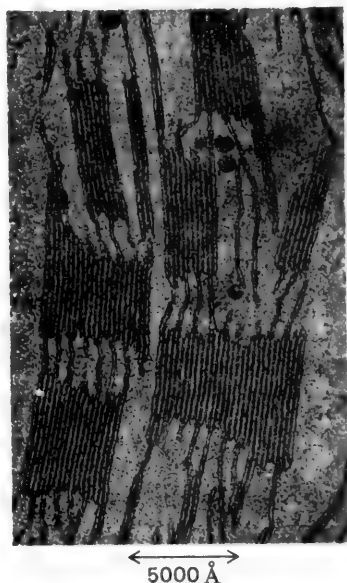


图19-1 菠菜叶的部分叶绿体的电镜照片。  
堆叠形式的类囊体膜称为基粒。  
[蒙Dr. Kenneth Miller特  
许。]

### 光合作用基本方程式的发现

在十八世纪末已能写出光合作用基本方程式的大部分了。1771\* 年普里斯特利，J. (Joseph Priestley) 发现了光合作用中氧的释放（图19-2）。他发现植物能够“净化被燃烧的蜡烛所恶化的空气”。他把一个薄荷枝条放在一倒扣在水盆里的钟罩内，并且发现几天以后“空气既不会使蜡烛熄灭，也不会对我放进去的小鼠有丝毫的不利”。这位十八世纪的伟

\* 原文误为1780年——译者注。

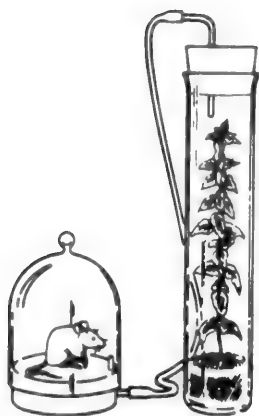


图19-2 普里斯特利 (Priestley)  
关于光合作用的经典实验。  
〔依据 E. I. Rabinowitch,  
Photosynthesis. Copyright  
©1948 by Scientific  
American, Inc. All rights  
reserved.〕

大化学家也是新教徒和英国的官员。事实上，神学、哲学和政治都是他最感兴趣的。1791年，普里斯特利因为同情法国革命被迫离开英国。他去了法国，随后又到了美国，在苏斯奎罕那 (Susquehanna) 河的高岸上渡过了平静的几年之后，于1804年去世。和普里斯特利同时代的另一个人却遭受了完全不同的命运，这个人为阐明光合作用的基本过程打下了基础。他是拉瓦锡，A. (Antoine Lavoisier)，他设计了掌握气体的方法而且发现了氧化作用的概念和化学反应中物质不灭的定律。他参与了君主政体，于1794年被法国革命者处死。宣布判决书的法官说“共和国不需要科学家”。

在阐明光合作用方面下一个重要的贡献是荷兰人英根胡兹，J. (Jan Ingenhousz) 作出的，他是奥斯特莱茵 (Austrian) 女皇的御医。英根胡兹是一个老于世故的人，他喜欢到伦敦去游览。有一次他听到关于普里斯特利的植物净化空气的讨论并且为这一讨论所吸引，于是他决定自己必须利用那“及早的机会”做一些实验。六年以后英根胡兹在伦敦附近租了一座别墅，在那里渡过了一个夏天，狂热地进行了五百多次实验。他发现了光在光合作用中的作用：

我观察到植物不仅由于生长在坏的空气中六或十天而能够改造这种空气，正如普里斯特利博士的实验所指出的，而且植物能在数小时之内完全全地进行这一重要的工作。我还观察到这种奇妙的作用完全不是由于植物的生长，而是由于阳光对植物的影响。

英根胡兹迅即发表了发现，因为他知道别人会和他竞赛。在夏末以前，他出版了一本书，题为《关于植物的实验，发现植物在阳光下净化普通空气的伟大力量，而在阴处或夜间则恶化空气》。

英根胡兹怕被人抢先是有理由的。森尼比叶，J. (Jean Senebier)，瑞士的牧师，也在日内瓦进行类似的实验。他的杰出贡献是证明“固定的空气”——即 $\text{CO}_2$ ——是在光合作用中被利用的。水在光合作用中的作用是索修尔，T. (Theodore de Saussure) 所证实的，他也是日内瓦人。他证明植物所产生的有机物和所放出的氧的总重量比所消耗的 $\text{CO}_2$ 的重量多得多。根据拉瓦锡的物质不灭定律，索修尔得出结论说还有另一种物质被利用了。他的体系中，外加的东西只有 $\text{CO}_2$ 、水和光。因此，索修尔的结论是，这另一种物质必定是水。

对于光合作用基本方程式的最后的贡献是大约半世纪以后才出现的。罗伯特·迈耶，J. (Julius Robert Mayer)，一位德国的外科医生，于1842年发现了能量不灭定律。迈耶认识到植物把日光能变成了化学的自由能：

植物利用了能的一种形式，即光；又产生了另一种形式，即化学能。

光合作用所贮藏的能量极大。地球上的光合作用每年贮藏 $10^{17}$  kcal 以上的自由能，这相当于同化 $10^{10}$ 吨以上的碳，形成碳水化合物和其它形式的有机物。



## 叶绿素是接受光的分子

迈耶说：“自然给自己提出了这样的问题：如何抓住照射到地球上的光并且把这种最难以捉摸的能量以牢固的形式贮藏起来。”

捕获这种最难以捉摸的能量的机理是什么？第一步是光被光接受体分子吸收。

绿色植物叶绿体中主要的光接受体是叶绿素 $a$ （图19-3），一种取代的四吡咯。

吡咯的四个氮原子均与镁原子络合。这样，叶绿素是镁卟啉，而血红素是铁卟啉。叶绿素的卟啉环结构与血红素的结构有下列的区别：（1）一个吡咯被部分还原；（2）有一环戊酮环与一个吡咯稠合；（3）叶绿素中两个酸的侧链均被酯化，而在血红素中它们都是游离的。叶绿素中一个酸侧链为甲酯，另一个则为叶绿醇·（ $C_{20}H_{39}OH$ ）的酯。这一长链的醇是由四个异戊二烯单位组成的，因而高度疏水。叶绿素 $b$ 与叶绿素 $a$ 的区别

在于一个吡咯上的取代基不同：叶绿素 $b$ 中有一甲酰基代替了甲基。

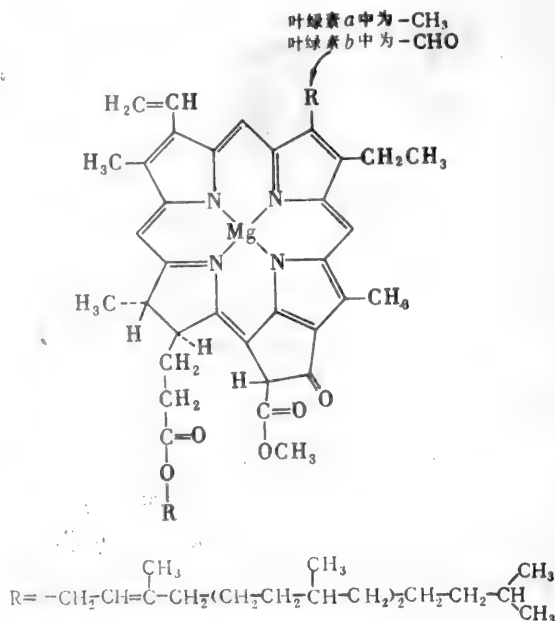


图19-3 叶绿素 $a$ 和 $b$ 的结构式。

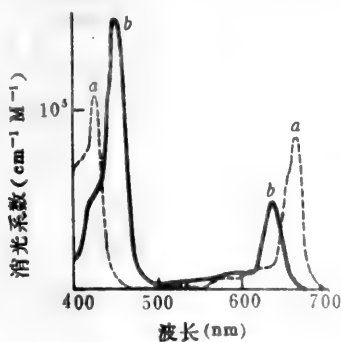


图19-4 叶绿素 $a$ 和 $b$ 的吸收光谱。

这些叶绿素是非常有效的光接受体，因为它们富有单键和双键交替组成的网。换言之，它们是多烯类。它们具有对可见光谱非常强的吸收带，到达地球的日光中也以这一部分为最多。叶绿素 $a$ 和 $b$ 的高峰消光系数均大于 $10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ，属于有机化合物中所观察到的最高值之列。

叶绿素 $a$ 和 $b$ 的吸收光谱不同（图19-4）。叶绿素 $a$ 吸收得不多的光，例如460nm的光，可被叶绿素 $b$ 所吸收，叶绿素 $b$ 对此波长吸收很多。因此，这两种叶绿素在吸收射来的日光方面是互补的。仍然有一较大的波段，从500至600nm，是弱吸收的。不过大多数植物并不需捕获这一波段的光，因为红和蓝两部分的光已被吸收得够多的了。

光合作用的原初过程发生在一有高度组织的膜系统中

典型的光合细胞器，即叶绿体，长 $5 \mu\text{m}$ 。叶绿体也象线粒体一样，有外膜和内膜，还有夹在其间的膜间空间（图19-5）。内膜包被基质，基质中含有可溶性酶和称为类囊体的膜结

构，类囊体是扁平的囊。一叠这样的囊称为基粒。不同的基粒由称为基质片层的膜区域联结

起来。类囊体膜将类囊体空间与基质空间分开。这样，叶绿体有三种不同的膜（外膜、内膜和类囊体膜）和三种彼此分隔的空间（膜间空间、基质空间和类囊体空间）。正在发育的叶绿体中，类囊体是由内膜的内陷而形成的，因此它们类似于线粒体的嵴。

类囊体膜含有叶绿素分子和能量转化机器中的其它组分。它大约有等量的脂类和蛋白质。脂类的组成是非常特别的：全部脂类中约有40%是半乳糖脂，4%是硫脂，只有10%是磷脂。类囊体的膜也象线粒体的内膜一样，是大多数分子和离子都不能透过的。基质中含有可溶性酶，能利用类囊体所合成的NADPH和ATP把 $\text{CO}_2$ 转变成糖。叶绿体含有它自身的DNA（541页）以及合成RNA和蛋白质的机构。

所以，叶绿体是一种有相当的独立自主性的细胞器。叶绿体的内膜含有许多不同化合物（如ATP和双羧酸）的转运体（translocator），内膜是叶绿体和细胞的其余部分之间相互作用的部位。叶绿体的外膜象线粒体的外膜一样，对小分子和离子的透性很大。

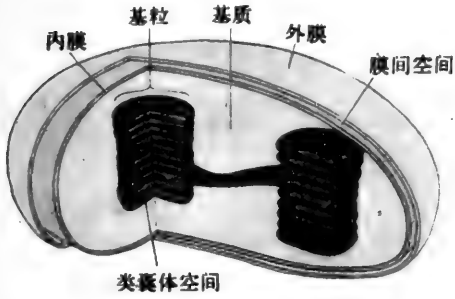


图19-5 叶绿体示意图。[依据 *Biology of the Cell* by Stephen L. Wolfe, © 1972 by Wadsworth Publishing Company, Inc., Belmont, California 94022.]

### 光合单位：光子汇集到作用中心内

如果测量光合速率与光强度变化的关系，那么在低强度下它们成线性关系，在高光强度下则达到一饱和值（图19-6）。在强光下之所以观察到饱和值是因为利用所吸收光子的化学反应成为限速步骤。因此，可将光合作用分为光反应与暗反应。不久即将谈到，光反应产生NADPH和ATP，而暗反应则利用这些高能分子去还原 $\text{CO}_2$ 。

1932年，埃默森，R.（Robert Emerson）和阿诺德，W.（William Arnold）测量了小球藻（*Chlorella*）细胞暴露在闪光下数微秒时，光合作用的氧产量。他们预期会发现每闪光产量会随闪光强度而增加，直到每一个叶绿素分子吸收一个光子为止，这些光子随后在暗反应中被利用。他们在实验中所观察到的完全出乎意料之外，饱和的闪光只能使每2,500个叶绿素分子产生一分子 $\text{O}_2$ 。

这一实验导至光合单位概念的形成。加弗朗，H.（Hans Gaffron）提出，光是由几百个叶绿素分子吸收的，然后这些分子再将它们的激发能传递到一个发生化学反应的部位（图19-7）。这一部位就称为作用中心。因此，在光合单位中大多数叶绿素分子的功能是吸收光。只有一小部分叶绿素，就是那些位于作用中心的叶绿素，才引起光能变成化学能的转

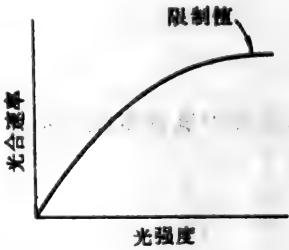


图19-6 当光强度足以激发仅仅一小部分叶绿素分子时，光合速率就达到一限制值。

化。位于作用中心的叶绿素在化学上与光合单位中的其它叶绿素是完全相同的，但是由于它们的独特环境，它们的性质是不同的。一个差别就是它们的激发态的能级低于其它叶绿素的，这使得它们成为能量陷阱。叶绿素分子所吸收的能量在光合单位中传来传去，直到它到达作用中心的叶绿素为止。能量向作用中心的传递非常迅速，发生在 $10^{-10}$ 秒之内（图19-8）。

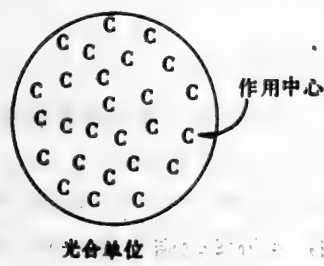


图19-7 光合单位示意图。天线叶绿素分子将其激发能传递到特殊的在作用中心的叶绿素。

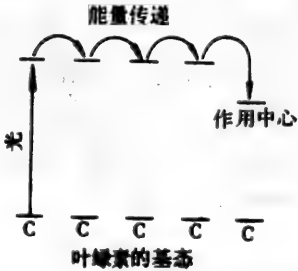
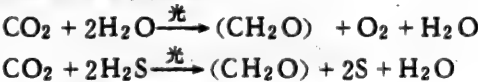


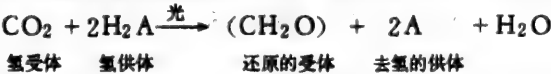
图19-8 天线叶绿素和作用中心的叶绿素的激发态能级示意图。

### 光合作用中所放出的氧来自水

现在我们来讨论光合作用中的化学变化。绿色植物所放出的氧的来源对于光合作用的机理有重要意义。早在1931年，关于许多种生物中光合作用的比较研究已揭示了这种来源。某些光合细菌在光下将硫化氢转化为硫。范·尼尔，C.(Cornelis Van Niel) 察觉到绿色植物中和绿色硫细菌中光合作用的反应是非常类似的：

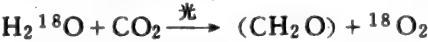


光合细菌所形成的硫就相当于植物所放出的氧。范·尼尔提出一个光合作用的通式：



绿色植物中氢供体 $\text{H}_2\text{A}$ 是水，光合硫细菌中是 $\text{H}_2\text{S}$ 。因此，可以把植物的光合作用写成一个 $\text{CO}_2$ 被来自水的氢所还原的反应。这样氧的释放就是这一去氢过程的必然结果。关于光合作用的这一观点的实质就是水被光裂解。

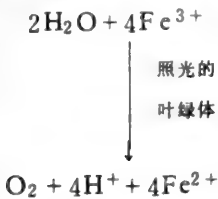
1941年有了氧的重同位素，即 $^{18}\text{O}$ ，于是有可能直接检验这一概念。事实是，用富集了这种同位素的水进行光合作用时 $^{18}\text{O}$ 出现在所释放的氧中。这一结果肯定了光合作用中所形成的氧来自于水的假设。



### 希尔反应：照光的叶绿体释放氧并还原人工的电子受体

1939年，希尔 (Robert Hill) 发现在适当的电子受体，例如高铁氰化物存在下，分离的

叶绿体在照光时释放氧。同时高铁氰化物被还原为亚铁氰化物。希尔反应是阐明光合作用机理过程中的一个里程碑，其理由有：



1. 它证明能在没有 $\text{CO}_2$ 还原时发生氧的释放，从而解剖了光合作用。人工的电子受体，例如高铁氰化物能够代替 $\text{CO}_2$ 。
2. 它肯定了所放出的氧来自水而不是来自 $\text{CO}_2$ ，因为根本没有 $\text{CO}_2$ 存在。

3. 它证明分离的叶绿体能进行光合作用的重要的部分反应。

4. 它揭示了光合作用中的基本过程是光所活化的电子逆着化学势梯度而从一种物质传送到另一种物质。高铁离子被光还原为亚铁离子就是光能转变为化学能。

### 光合作用需要两种光系统的相互作用

许多实验结果导致同一发现，即叶绿体中有两个不同的光系统。研究的是作为照射光波长的函数的光合速率。每一波长下所测得的光合速率除以量子数就是这一过程的相对量子效率。对于一种单一的光接受体，可以预料在其全部吸收带的范围内量子效率与波长无关。但光合作用却不然：在大于680nm的波长下光合作用的量子效率突然下降，虽然叶绿素仍然吸收在680至700nm范围内的光(图19-9)。但是，使用长波时的光合速率可因加一较短波长的光(例如600nm)而得到加强。在600nm和700nm的光同时存在下的光合速率大于这两种光分别存在下所得到的光合速率之和。这些观察称为红降和增益现象，它们导致埃默森提出：光合作用需要两个光反应的相互作用，两者都能被小于680nm的光所推动，但其中只有一个能为较长的波长所推动。

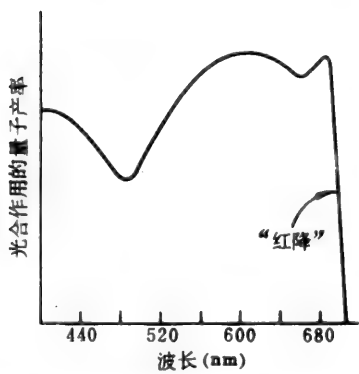


图19-9 当激发的波长大于680nm时光合作用的量子产率突然下降。

### 两个光系统的作用

光系统 I 能被短于700nm的光所激发，它产生一种强还原剂，后者又导致NADPH的形成。反之，光系统 II 需要波长短于680nm的光，它产生一种强氧化剂，而后者又导致 $\text{O}_2$ 的形成。此外，光系统 I 还产生一种弱氧化剂，光系统 II 也产生一种弱还原剂。这两种东西相互作用的结果是产生ATP。为阿尔农，D. (Daniel Arnon) 所发现的光合作用的这一部分称为光合磷酸化(图19-10)。

光系统 I 和 II 在结构上是不同的。当用去污剂处理类囊体膜时，光系统 I 颗粒首先释放出来。利用密度梯度离心法，可以将只有光系

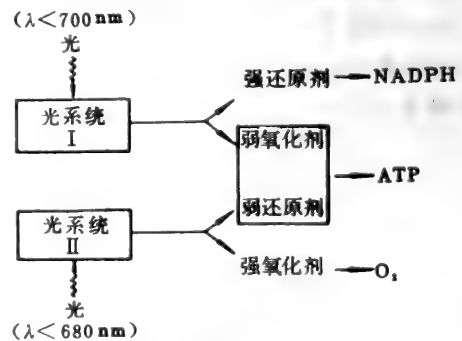


图19-10 光合作用中光系统 I 与 II 的相互作用。

统 I 活性的颗粒与富于光系统 II 活性的颗粒分开。大多数叶绿素分子都是与特殊的蛋白质结合的。已从光系统 I 颗粒中分离出了一种复合物，它是 14 个叶绿素 *a* 分子结合在一种 110kda 的蛋白质上。第二种类型的复合物是由光系统 II 颗粒制得的，它是 3 个叶绿素 *a* 分子和 3 个叶绿素 *b* 分子结合在一个 28 kda 的蛋白质上。研究得最清楚的叶绿素-蛋白复合物是由绿色细菌提纯的，它由 3 个 50kda 的亚基组成，每一亚基有 7 个细菌叶绿素分子（图 9-11）。这些复合物中蛋白质的一个作用是维持一种最适的几何形状以利于叶绿素之间的能量传递。

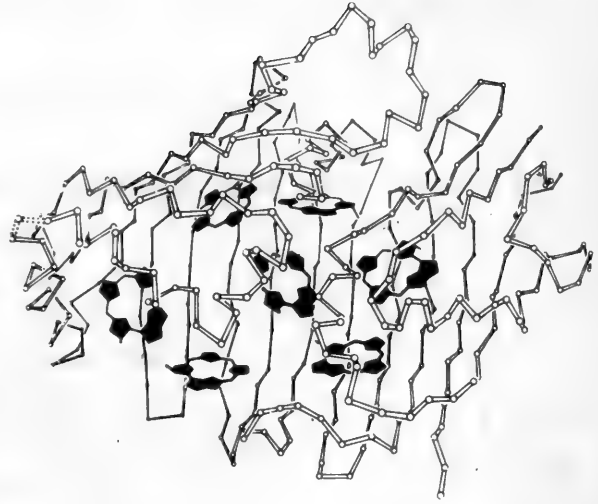


图 19-11 绿色光合细菌中一种细菌叶绿素-蛋白复合物的结构。  
[蒙 Dr. Brian Matthews 特许。]

## 光系统 I 通过还原态的铁氧还蛋白而产生 NADPH

光系统 I 的作用中心（图 19-12）是存在于独特环境的叶绿素 *a* 分子。吸收高峰从 680nm 移至 700nm。因此，这种作用中心称为 **P700**（P 代表色素）。

许多叶绿素分子吸收光并将激发能传递给 P700。当 P700 被激发时，它将一个电子传递给结合态的铁氧还蛋白（ferredoxin）即 P430，它是与膜结合的铁氧还蛋白，一种 11.6kda 的铁-硫蛋白，属于  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  类型。在暗中，P700 的氧化还原电势为  $+0.4\text{V}$ 。当 P700 被光激发时，它的电子分布就不同了，于是它的氧化还原电势就变为  $-0.6\text{V}$  左右。所以，光把光系统 I 中的电子从约为  $+0.4\text{V}$  的电势跃变为  $-0.6\text{V}$  的电势。红光子的能量  $1.8\text{eV}$ （电子伏特）足以使电子提高  $1.0\text{V}$ 。一个激发的电子从 P700 传至结合态的铁氧还蛋白使得 P700 缺一个电子。P700 的这一氧化形式必须再获得一个电子，然后 P700 才能再起到作用中心的作用。后文即将谈到这一回复的电子的来源。

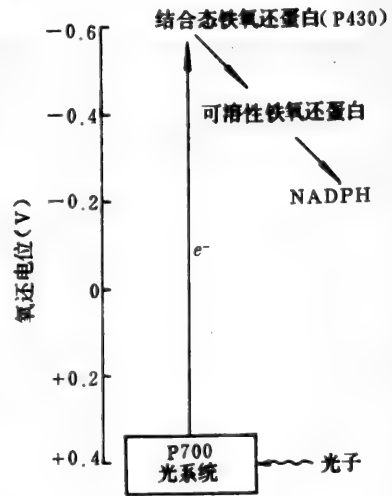
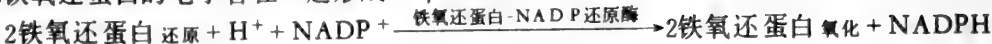


图 19-12 光系统 I 形成 NADPH。

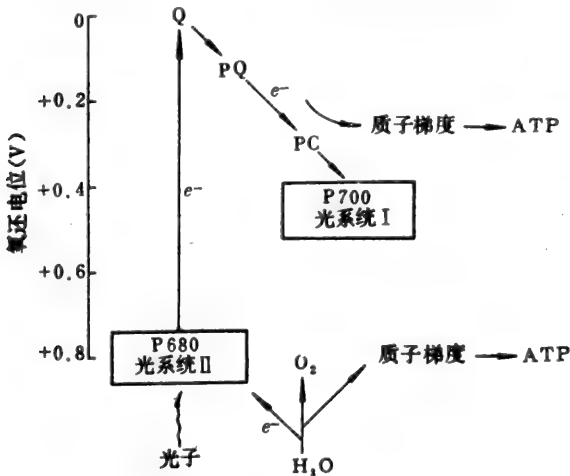
然后结合态的铁氧还蛋白将其电子传递给可溶形式的铁氧还蛋白。铁氧还蛋白活性部位的铁原子反复发生氧化和还原。还原态的铁氧还蛋白将其电子传递给  $\text{NADP}^+$ ，形成 NADPH。这一反应是由铁氧还蛋白-NADP 还原酶所催化的，它含有 FAD 作为辅基。注意  $\text{NADP}^+$  还原为 NADPH 是一双电子的过程，而铁氧还蛋白是一单电子的载体。因此，必定是来自两个还

原态铁氧还蛋白的电子合在一起形成一个NADPH。



光系统 II 产生一分解水的强氧化剂

关于作用中心 (P680) 和光系统 II 的原初电子受体所知甚少 (图19-13)。这一作用中心



的氧化还原电势约为 +0.8V。光在这一作用中心内造成了一种非常强的氧化剂  $Z^+$  (此作用中心的氧化型或由它产生的氧化剂) 和一种弱的还原剂  $Q^-$ 。  $Z^+$  从水中吸取电子并形成  $O_2$ 。锰在这一过程中起着关键的作用。



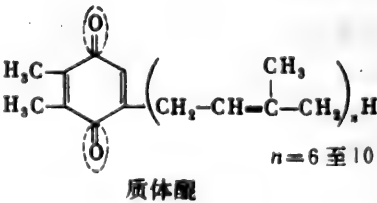
图19-13 光系统 II 的激发导致氧的形成和把电子传递给光系统 I。这些过程造成了跨过类囊体膜的质子梯度。(PQ代表质体醌, PC代表质体蓝素。)

电子从光系统 II 流向光系统 I 时形成质子梯度

两个光系统是由一系列电子载体联系起来的, 其作用有二:

表 19-1 光系统 I 和光系统 II 的组成

光系统 I	
~200	天线叶绿素
~50	类胡萝卜素类
1	P 700作用中心
1	细胞色素 $c_{552}$ (f)
1	质体蓝素
2	细胞色素 $b_{559}$ ( $b_6$ )
1	结合态铁氧还蛋白
1	可溶性铁氧还蛋白
1	铁氧还蛋白-NADP 还原酶
光系统 II	
~200	天线叶绿素
~50	类胡萝卜素类
1	P 680作用中心
1	原初电子供体 ( $Z$ )
1	原初电子受体 ( $Q$ )
~4	质体醌
6	锰原子
2	细胞色素 $b_{559}$



1. 电子通过这一载体链从光系统Ⅱ流向光系统Ⅰ。这些电子是再生P700的还原形式所必须的，它是光系统Ⅰ的作用中心。

2. 当电子流过这一链时，形成了一种跨过类囊体膜的质子梯度。释放氧过程中所形成的质子也对这种质子梯度有贡献。类囊体内的空间变得更酸。这一质子梯度推动了ATP的合成（338页）。

来自光活化的光系统Ⅱ作用中心的电子被传递给Q，Q是结合得牢固的质体醌的分子。这种醌与泛醌（239页）和维生素K（189页）极为相似，泛醌是线粒体中电子传递链的成员。然后电子由Q传递到可移动的质体醌的库，再传至细胞色素 $b_{559}$ 。电子传递链的下一个成员是细胞色素 $c_{552}$ （以前称为细胞色素 $f$ ），它是一种膜中的蛋白，与线粒体中的细胞色素 $c$ 不同。从光系统Ⅱ到Ⅰ的最后一个电子载体是质体蓝素，一种10.5kda1的蛋白质，有一个铜原子与四个基团整合，这四个基团是：半胱氨酸、甲硫氨酸和两个组氨酸侧链（图19-14）。这种配位体的几何图形是扭曲的，不象小分子量的 $Cu^{2+}$ 络合物的特征那样是平面的簇。当Cu在+1和+2氧化状态之间变动时，在Cu原子上的定位张力可能促进电子转移。铜原子靠近质体蓝素分子的表面，仅仅为组氨酸侧链所保护，因而电子可通过直接的机理（250页）而传递给Cu。电子由还原态质体蓝素传递到氧化态的P700，于是这一作用中心又能在照光时起电子供体的作用而形成

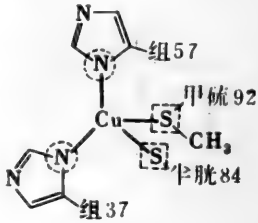
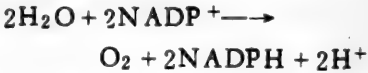


图19-14 质体蓝素中配位铜离子的结构。

NADPH。光系统Ⅰ和Ⅱ的光活化所产生的净反应是



换言之，光使电子从 $H_2O$ 流到NADPH（图19-15）。

### 通过光系统Ⅰ的循环电子流也能形成ATP

来自光系统Ⅰ的作用中心P700的电子还有另一条传递途径。结合态铁氧还蛋白中的高电势电子能够传递至细胞色素 $b_{563}$ 而不是 $NADP^+$ 。然后这一电子通过细胞色素 $c_{552}$ 和质体蓝素而流回P700的氧化型。换言之，有一种循环的电子流。当电子经过细胞色素 $b_{563}$ 和质体蓝素又回到作用中心时，产生ATP。因此这一过程称为循环光合磷酸化（图

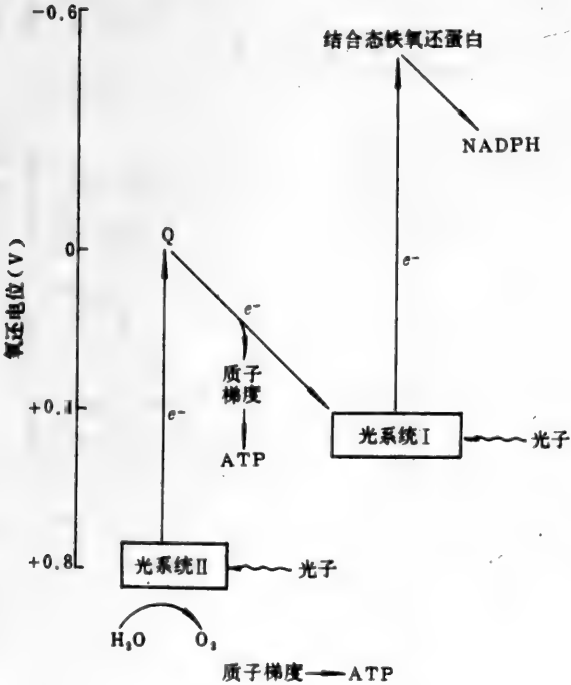
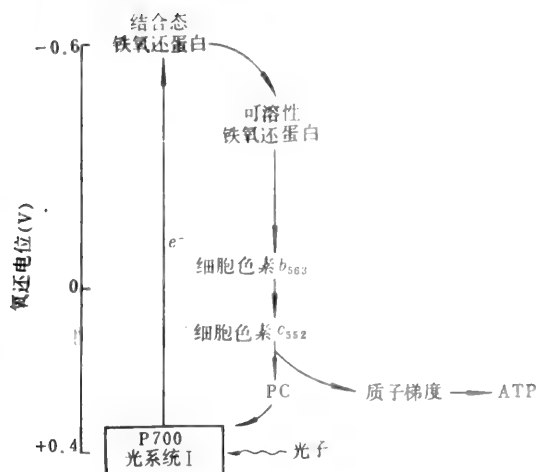


图19-15 非循环光合磷酸化中的电子流。电子从 $H_2O$ 流到 $NADP^+$ ，形成NADPH。

19-16)。这种方式是ATP的生成并不伴随着NADPH的形成。光系统Ⅱ不参与循环光合磷





酸化,因此在这一过程中不能由 $H_2O$ 形成 $O_2$ 。当 $NADP^+$ 不够多,不足以接受还原型铁氧还蛋白的电子时,循环光合磷酸化就起作用。当 $NADPH$ 与 $NADP^+$ 的比值高时,就存在这种情况。

图19-16 循环光合磷酸化中的电子流。在吸收光子时电子从光系统I的作用中心P700传至结合态的铁氧还蛋白,然后又回到P700。

### 跨过类囊体膜的质子梯度推动ATP的合成

1966年耶根多尔夫, A. (Andre Jagendorf) 证明当强加一跨过类囊体膜的人工pH梯度时,叶绿体就能在暗中合成ATP。这一暂时的pH梯度是将叶绿体浸泡在pH 4的缓冲液中数小时而得到的。然后迅即将这种叶绿体与含有ADP和 $P_i$ 的pH 8的缓冲液混合。基质的pH突然增至8,而类囊体空间的pH仍为4。于是突然发生ATP的合成,同时跨过类囊体膜的pH梯度也消失(图19-17)。这一揭露事实真相的实验强有力地支持了ATP合成的化学渗透假设(241页)。

实际上,叶绿体中ATP合成的机理与线粒体中的非常相似。在光合磷酸化和氧化磷酸化中ATP的形成都是由质子移动力所推动的。其次,叶绿体中催化ATP形成的酶集合体,称为 $CF_1$ - $CF_0$ 复合物(C代表叶绿体,F代表因子),它与线粒体中的 $F_1F_0$ 复合物也极为相似。 $CF_1$ 催化由ADP和 $P_i$ 形成ATP。它含有各自成对的五种亚基,质量为325 kdal。 $CF_0$ 含有质子通道,是由三种亚基组成的。类囊体膜外表面的疙瘩就是这些合成ATP的复合物的 $CF_1$ 单位(图19-18)。

通过取向不对称的光系统I和II的电子传递产生了一种跨过类囊体膜的很大的质子梯度。于是类囊体内的空间变得非常酸,pH接近于4。光所引起的跨膜的质子梯度约为3.5 pH单位。如前所述(242页),质子移动力 $\Delta p$ 包括pH梯度的贡献和膜电位的贡献。在叶绿体中,几乎全部 $\Delta p$ 都是来自于pH的梯度,而在线粒体中膜电位的贡献较大。存在这种区别的原因是类囊体膜对于 $Cl^-$ 和 $Mg^{2+}$ 透性较大。光引起 $H^+$ 转运到类囊体空间内,同时就有 $Cl^-$ 沿着同一方向转运或 $Mg^{2+}$ 沿着相反方向转运(每2 $H^+$ 转运1 $Mg^{2+}$ )。当然,这就保持

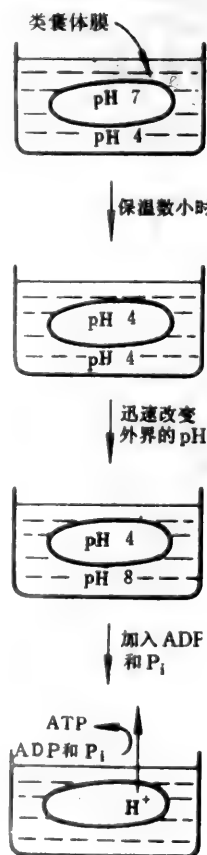


图19-17 在强加-pH梯度后叶绿体中ATP的合成。



了电中性而不会产生膜电位。跨过类囊体膜的0.2V的质子移动力相当于约每克分子质子4.8 kcal。每合成一个ATP约有三个质子流经 $CF_1-CF_0$ 复合物,这相当于向每克分子ATP输入14.4kcal自由能。如果pH梯度小于两个单位,就没有ATP的合成,因为这时推动力太小。

$CF_1$ 在类囊体膜的基质一侧,所以新合成的ATP立即被释放到基质空间里去。同样,光系统I所形成的NADPH也被释放到基质空间里。这样,光合作用的光反应的产物,ATP和NADPH就都放在合适的位置上,以备随后的暗反应利用,在暗反应中 $CO_2$ 转变为碳水化合物。

### 用放射性标记法阐明碳的途径

1945年,卡尔文, M. (Melvin Calvin)及其同事开始了一系列的研究,其结果是阐明了光合作用的暗反应。

他们在工作中用的是单细胞的绿藻小球藻 (Chlorella), 因为这种生物易于以高度的重复性进行培养。后来证明了他们的发现适用于许多不同的生物,从光合细菌到高等植物。

他们工作的目的是确定 $CO_2$ 被固定为碳水化合物的途径。实验的策略是用放射性的 $^{14}C$ 去追踪 $CO_2$ 。将放射性的 $^{14}CO_2$ 注入照光的藻的悬液中,此时藻已利用正常的 $CO_2$ 进行光合作用。经过预先选定的时间后,将悬液滴入乙醇中将藻杀死,这也停止了酶促反应。

用双向纸层析法分离并鉴定藻中的放射性化合物。然后将纸层析图谱压在照相底板上,在纸上含有放射性斑点的地方,底板就变黑了。卡尔文在他的诺贝尔讲演中说:他们的主要数据就“在于这些黑色斑点的数目、位置和强度——即放射性上。可惜的是,纸上通常并没有印上这些化合物的名字,而以后的十年中我们主要的困难工作就是正确地给底板上的这些黑斑点贴上标签”。

### $CO_2$ 与核酮糖二磷酸反应形成两个磷酸甘油酸

照光60秒钟后的放射性色谱非常复杂 (图19-19), 不可能检出 $CO_2$ 固定的最早的中

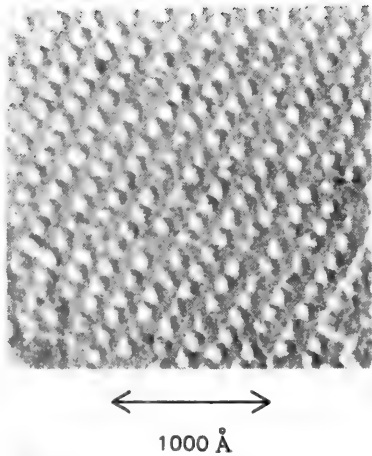


图19-18 菠菜类囊体膜的冰冻蚀刻电镜照片。可看到有规则的格子,这是穿过膜的颗粒。[承蒙Dr. Kenneth Miller提供。]

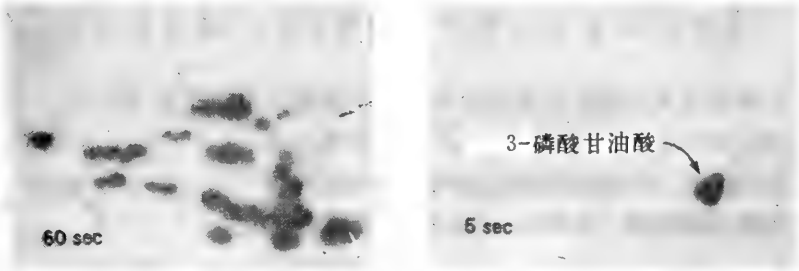
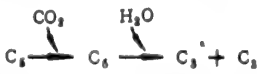


图19-19 注入 $CO_2$ 后5秒钟和60秒钟,照光的藻悬液的放射性色谱。[蒙Dr. J. A. Bassham特许。]

间产物是什么。但是，仅照光五秒钟后的情况就简单得多了。事实上只有一个显著的放射性斑点，已证明是**3-磷酸甘油酸**。

第一个可测定出来的放射性中间产物是**3-磷酸甘油酸**，这说明可能有一种二碳化合物为  $\text{CO}_2$  的受体，但已证明并非如此。实际的反应序列要复杂得多：



$\text{CO}_2$  分子与核酮糖1,5-二磷酸缩合形成一过渡的六碳化合物，它又迅速水解成为两分子的**3-磷酸甘油酸**。总反应是高度放能的 ( $\Delta G^{0'} = -12.4 \text{ kcal/mol}$ )。

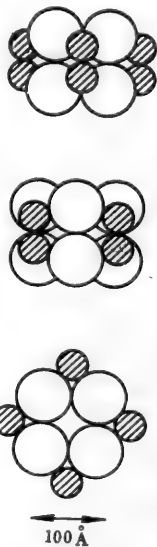
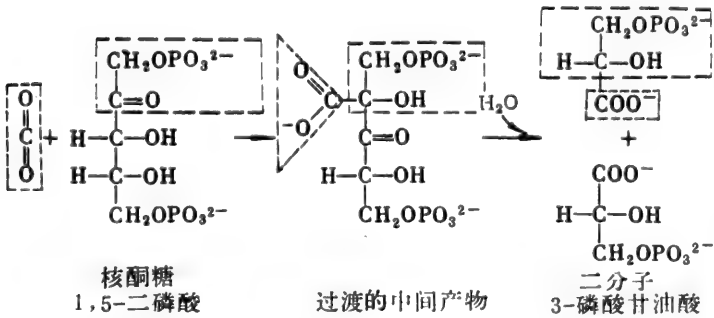
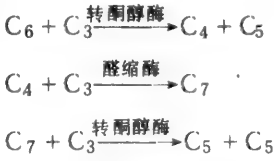


图19-20 核酮糖1,5-二磷酸羧化酶结构示意图。[承蒙 Dr. David Eisenberg 提供。]

这一反应为核酮糖1,5-二磷酸羧化酶所催化，它位于类囊体膜近基质的表面上。这种酶在叶绿体中非常多，占其全部蛋白质的60%\* 以上。事实上，核酮糖1,5-二磷酸羧化酶大概是生物圈中最丰富的一种蛋白质。它由八个大亚基（55kda）和八个小亚基（15kda）组成，它们排成两层（图19-20）。大亚基单独就有催化活性，小亚基起调节作用。这种酶既是加氧酶（343页），又是羧化酶。

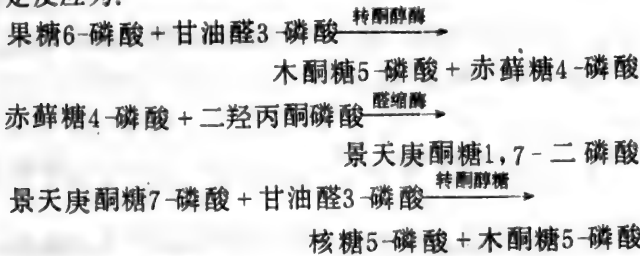
### 果糖6-磷酸的形成和核酮糖1,5-二磷酸的再生

**3-磷酸甘油酸**转变为**果糖6-磷酸**的步骤类似于**葡糖异生途径**（265页）（图19-21），只有一点不同，即叶绿体中的**甘油醛3-磷酸脱氢酶**需要的是  $\text{NADPH}$  而不是  $\text{NADH}$ 。这些反应使  $\text{CO}_2$  到达六碳糖的水平。剩下的事情就是核酮糖二磷酸——第一个暗步骤中  $\text{CO}_2$  的受体——的再生。问题在于由六个碳的糖和三个碳的糖建



\* 原文误为16%——译者注。

造五个碳的糖。这是由转酮醇酶和醛缩酶所催化的反应来完成的。转酮醇酶也在戊糖磷酸途径（255页）中起作用。回忆一下转酮醇酶，它是硫胺素焦磷酸（TPP）酶，从酮糖上把二碳单位（CH<sub>2</sub>OH—CO—）转移到醛糖上。醛缩酶催化二羟丙酮磷酸和醛之间的醛醇缩合反应。这种酶对二羟丙酮磷酸有高度的专一性，但能接受许多不同的醛。在卡尔文循环中转酮醇酶和醛缩酶所催化的特定反应为：



还有四种酶是光合作用的暗反应所需要的。一种是磷酸酯酶，它使景天庚酮糖1,7-二磷酸水解为景天庚酮糖7-磷酸。第二种是磷酸戊糖差向异构酶，它将木酮糖5-磷酸转变为核酮糖5-磷酸。第三种，磷酸戊糖异构酶，使核糖5-磷酸转变为核酮糖5-磷酸。回想一下，第二种酶和第三种酶也参与戊糖磷酸途径（257页）。以上这些反应的总和是：

果糖6-磷酸 + 2 甘油醛3-磷酸 + 二羟丙酮磷酸 → 3 核酮糖5-磷酸  
最后，第四种，即磷酸核酮糖激酶，催化核酮糖5-磷酸的磷酸化，再生CO<sub>2</sub>的受体，核酮糖1,5-二磷酸。  
核酮糖5-磷酸 + ATP → 核酮糖1,5-二磷酸 + ADP + H<sup>+</sup>  
这一系列反应称为卡尔文循环（图19-22）

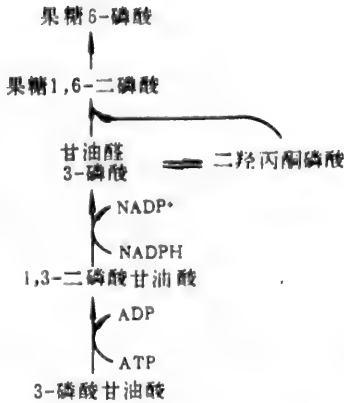


图19-21 叶绿体中3-磷酸甘油酸转变为果糖6-磷酸的途径。

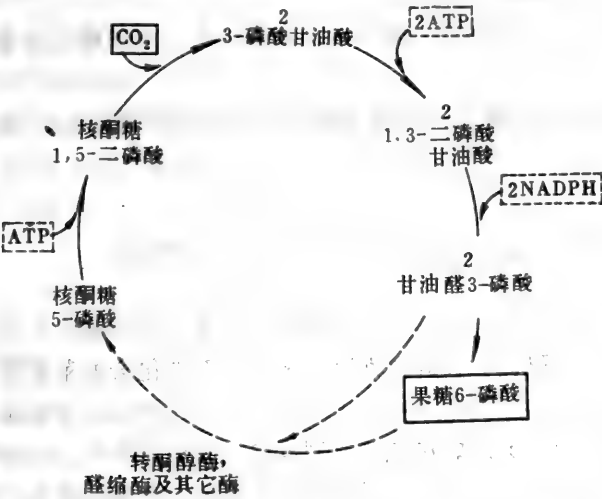


图19-22 卡尔文循环。由三碳糖和六碳糖到核酮糖5-磷酸的形成未在略图中写明。

### 三个ATP和两个NADPH使CO<sub>2</sub>到达六碳糖的水平

合成一个六碳糖需要消耗多少能量？需要卡尔文循环转六轮，因为每转一轮只还原一个碳原子（图19-22）。把12个3-磷酸甘油酸分子磷酸化为1,3-二磷酸甘油酸需要消耗12个ATP，把12个1,3-二磷酸甘油酸还原为甘油醛3-磷酸需要消耗12个NADPH。再生核酮糖1,5-二磷酸还要消耗六个ATP。

现在我们写一个卡尔文循环的总反应的平衡方程式：



所以,把 $\text{CO}_2$ 转变成象葡萄糖或果糖这样的六碳糖要消耗三个ATP分子和两个NADPH分子。可按下法估算光合作用的效率:

1. 把 $\text{CO}_2$ 还原到六碳糖的水平的 $\Delta G^{0'}$ 为114 kcal/mol。

2.  $\text{NADP}^+$ 的还原是一个二电子过程。因此,形成两个NADPH就需要通过光系统I打入四个光子。光系统I所给出的电子要由光系统II来补充,光系统II又必须吸收相等数目的光子。因此需要八个光子束产生所需要的NADPH。把 $\text{CO}_2$ 转变为六碳糖所需要的三个ATP分子是同时形成的。

3. 一摩尔波长为600nm的光子含能47.6 kcal,因此八摩尔光子的能量输入为381 kcal。所以,在标准状况下光合作用的总效率至少为114/381,或30%。

## 卡尔文循环的调节

各种各样的控制机理保证只有当光合作用的光反应产生ATP和NADPH时卡尔文循环才运转。卡尔文循环中的限速步骤为核酮糖1,5-二磷酸羧化形成两分子3-磷酸甘油酸的反应。

核酮糖1,5-二磷酸羧化酶的活性至少通过三条途径为照光所显著促进:

1. 光系统I所形成的NADPH为羧化酶的变构活化剂。

2. 当pH从7增到9时酶促反应的速率显著增加。光诱导的类囊体内空间的酸化使基质的碱度增加,这就活化了羧化酶。

3. 羧化酶为 $\text{Mg}^{2+}$ 所活化。回忆一下,在照光时当质子被泵入类囊体空间时 $\text{Mg}^{2+}$ 被释放到基质中去(338页)。

## 热带植物有 $\text{C}_4$ 途径,它由于浓缩 $\text{CO}_2$ 而加速光合作用

热带植物如甘蔗,有一种辅助的途径把 $\text{CO}_2$ 运至其光合细胞中的卡尔文循环部位上去。这种途径存在的第一个线索来自于 $^{14}\text{CO}_2$ 的研究,其放射性首先出现于四碳化合物苹果酸和天冬氨酸中而不是3-磷酸甘油酸中。这一途径的实质是由哈奇(M.D.Hatch)和斯莱克(C.R.Slack)所阐明的,那就是 $\text{C}_4$ 化合物把 $\text{CO}_2$ 从叶肉细胞带到维管束鞘细胞中去,叶肉细胞与空气接触,鞘细胞则为光合作用的主要部位(图19-23)。维管束鞘细胞中 $\text{C}_4$ 化合物的脱羧作用使得卡尔文循环部位上的 $\text{CO}_2$ 保持一高浓度。 $\text{C}_3$ 化合物又回到叶肉细胞中,进行下一轮的羧化作用。

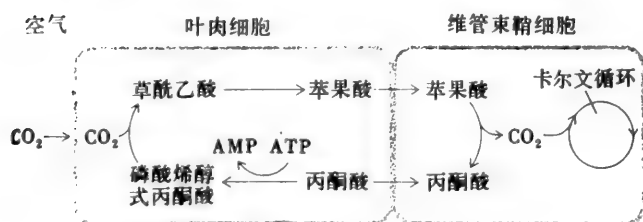
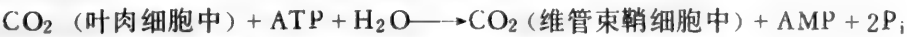


图19-23  $\text{C}_4$ 途径基本特征的示意图。

与磷酸烯醇式丙酮酸缩合形成草酰乙酸,此反应为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶所催化。在某些种属中,草酰乙酸被 $\text{NADP}^+$ 苹果酸脱氢酶转变为苹果酸。苹果酸进入维管束鞘细胞并在其

转运 $\text{CO}_2$ 的这一 $\text{C}_4$ 途径(图19-23)开始于叶肉细胞中, $\text{CO}_2$

叶绿体中被  $\text{NADP}^+$ -苹果酸酶所脱羧。所放出的  $\text{CO}_2$  以通常的方式进入卡尔文循环，即与核酮糖1,5-二磷酸缩合。脱羧反应所形成的丙酮酸又回到叶肉细胞中。最后，磷酸烯醇式丙酮酸又通过丙酮酸与  $\text{ATP}$  和  $\text{P}_i$  的反应而再生。这一独特的反应，被丙酮酸- $\text{P}_i$  双激酶催化，是由随后的  $\text{PP}_i$  的水解所推动的。这个  $\text{C}_4$  途径的总反应是：



这样，把  $\text{CO}_2$  转运到维管束鞘细胞的叶绿体中要消耗两个高能磷酸键。

当  $\text{C}_4$  途径与卡尔文循环共同运转时，总反应为：



注意当  $\text{C}_4$  途径把  $\text{CO}_2$  转运给卡尔文循环时，每形成一个六碳糖要消耗30个  $\text{ATP}$ ，而不是象在没有  $\text{C}_4$  途径时那样需要18个  $\text{ATP}$ 。 $\text{C}_4$  植物的维管束鞘细胞中的高  $\text{CO}_2$  浓度是由于额外消耗12个  $\text{ATP}$  而造成的，它是高光合速率的关键所在，因为当光充分时  $\text{CO}_2$  是限制因子。高  $\text{CO}_2$  浓度也减少了由于光呼吸所丢失的能量，下一节中将讨论光呼吸的过程。

### 乙醇酸是光呼吸的主要底物

照光的植物通过一称为光呼吸的过程消耗  $\text{O}_2$  并释放  $\text{CO}_2$ ，光呼吸与线粒体呼吸不同。光呼吸的生物学作用是一个谜。光呼吸的主要底物乙醇酸来自于磷酸乙醇酸，它又是由核酮糖1,5-二磷酸的加氧作用而来的（图19-24）。这一反应为核酮糖1,5-二磷酸羧化酶所催化，它既是加氧酶，又是羧化酶。事实上，加氧作用和羧化作用是使用同一活性部位的相互竞争的反应。这样形成的磷酸乙醇酸又在专一的磷酸酯酶的作用下水解为乙醇酸。随后的乙醇酸代谢发生在过氧化物酶体（亦称微体）中（图19-25）。乙醇酸被乙醇酸氧化酶氧化为乙醛酸。这一反应所产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  则被过氧化氢酶分解为  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ 。然后乙醛酸的转氨作用产生

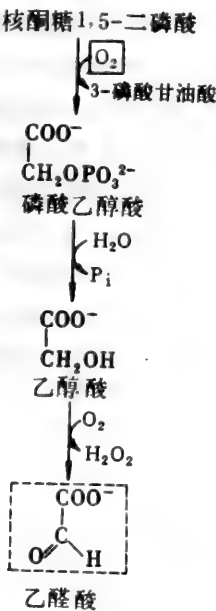


图19-24 乙醇酸的形成和分解。



图19-25 植物细胞中过氧化物酶体的电镜照片。[蒙Dr. Sue Ellen Frederick 特许。]

甘氨酸。在线粒体中，两分子甘氨酸形成丝氨酸。

光呼吸似乎是一个浪费的过程，因为有机碳转变为 $\text{CO}_2$ 而不产生ATP和NADH或有其它明显的收获。没有 $\text{C}_4$ 途径的植物通过光呼吸丢失其固定碳的25%到50%。反之，具有 $\text{C}_4$ 途径的热带植物几乎没有光呼吸，因为在它们的维管束鞘细胞中核酮糖1,5-二磷酸的加氧作用被高浓度的 $\text{CO}_2$ 竞争性地抑制了。核酮糖1,5-二磷酸羧化酶的加氧酶活性随温度而迅速增加，比羧化酶活性增加得快。因此，在高温下 $\text{C}_4$ 途径对于使光呼吸减弱是特别重要的。 $\text{C}_4$ 植物（有 $\text{C}_4$ 途径的）和 $\text{C}_3$ 植物（没有 $\text{C}_4$ 途径的）的地理分布现在可以用分子的术语来解释了。 $\text{C}_4$ 植物在高温和高光照的环境下有优越性，因而它们在热带分布广。 $\text{C}_3$ 植物在没有光呼吸时每形成一个六碳糖消耗18个ATP（与 $\text{C}_4$ 植物的30个ATP相比），在低于 $28^\circ\text{C}$ 的温度下效率较高，所以它们主要分布在温带。

### 盐细菌的紫膜蛋白泵入质子以合成ATP

对于光合磷酸化和氧化磷酸化机理的详细了解也来自对盐细菌光合过程的研究，这种细菌利用一种不同于叶绿素的吸光系统。这些细菌的生长需要高浓度的NaCl，最适浓度为 $4.3\text{ mol/L}$  NaCl（通常的海水含有 $0.6\text{ mol/L}$  NaCl）。盐细菌存在于天然的盐湖中和海水被蒸发产生盐的区域，例如旧金山湾的一个靠近机场的地方。这些细菌有细胞被膜，被膜由细胞膜和包围它的糖蛋白细胞壁组成。斯托依肯尼鄂斯，W.（Walther Stoeckenius）把细胞膜分成了黄、红和紫色的部分。黄色部分主要含有气囊的壁，气囊使得细菌能够调节其在水中的深度。红色部分含有呼吸链和氧化磷酸化的其它酶系统，此外还有一种红色的起屏蔽作用的色素，这种色素保护细菌免受蓝光的致死影响。紫色部分由 $26\text{ kdal}$ 的紫膜蛋白和四十种脂类组成。这种蛋白也称为细菌视紫红质，因为它也像动物眼睛中的视觉色素视紫红质（700页）一样，含有视黄醛作为生色团。视黄醛基团是通过质子化的希夫碱（Schiff-base）

键连在蛋白质的专一的赖氨酸侧链上的。

有氧时盐细菌通过氧化磷酸化合成ATP。

在缺氧时，它们转为一种光合作用的方式

（图19-26）。斯托依肯尼鄂斯及其同事们证明紫膜蛋白的作用是在照光时将质子从膜内泵至膜外。事实上，紫膜蛋白横跨细胞膜（图10-32，175页），正如我们对质子泵所预料的那样。闪光光谱的研究已证明，光使视黄醛的希夫碱键从吸收带为 $560\text{ nm}$ 的质子化形式转变成吸收峰为 $412\text{ nm}$ 的去质子化的形式。这一反应的循环要数毫秒，因此在强光下每一紫膜蛋白分子每秒钟能泵动数百个 $\text{H}^+$ 。这样所产生的质子移动

力随后被ATP合成系统（ $\text{F}_0\text{-F}_1$ ）所利用使ADP磷酸化，这种系统在空间上分开的红膜区域内。 $\text{F}_0\text{-F}_1$ 复合物的取向是其球状的 $\text{F}_1$ 面向细胞内部。用于进行氧化磷酸化和光合磷酸化的是同样的ATP合成系统。这一过程所产生的质子移动力也能推动离子和氨基酸向盐细菌内主动转运。

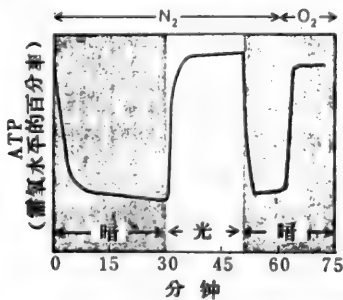


图19-26 证明无氧时照光盐细菌能合成ATP的实验。

[依据W. Stoeckenius. The purple membrane of salt loving bacteria. Copyright © 1978 by Scientific American, Inc. All rights reserved.]

因为有了提纯的紫膜部分，斯托依肯尼鄂斯和拉克尔 (Efraim Racker) 能以进行一个提供丰富资料的重组实验。他们做成了一种合成的磷脂囊泡，它含有盐细菌的紫膜蛋白和牛心线粒体的合成ATP的复合物 $F_1-F_0$  (图19-27)。将这些囊泡照光，结果形成了跨膜的质子梯度，并从ADP和 $P_i$ 产生ATP。加入质子载体取消质子梯度，则ATP的合成消失，这证明质子移动力是必要的。这种重组的囊泡只含有质子泵和ATP合成酶，并且是在一密闭的膜中，而膜又不能让质子透过。它们是化学渗透能量转换的最简单的模型系统。

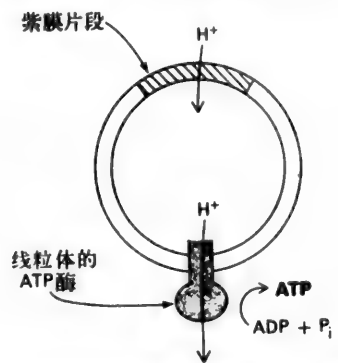


图19-27 含有紫膜蛋白和线粒体的合成ATP的复合物的重组的膜囊泡在照光时形成ATP。

概 要

光合作用的第一步是叶绿素分子吸收光，叶绿素是在叶绿体的类囊体膜中组成为光合单位的。激发能从一个叶绿素分子传至另一个，直到被作用中心捕获为止。在作用中心发生的关键变化是光活化的一个电子逆着化学势梯度而传递给一受体。绿色植物的光合作用需要两个光反应的相互作用。光系统I产生一强还原剂（结合态的铁氧还蛋白），它引起NADPH的形成。光系统II产生一强氧化剂，它使 $H_2O$ 形成 $O_2$ 。

电子从光系统II流经一电子传递链而到达光系统I并产生一质子梯度，这一梯度又导致ATP的合成。这样，光引起电子从 $H_2O$ 流向NADPH同时产生ATP。另一方面，通过称为循环光合磷酸化的过程也能产生质子梯度从而产生ATP而不形成NADPH，这是在光系统I吸收光后发生的。光合磷酸化也像氧化磷酸化一样，是由质子移动力推动的，因而也需要一个密闭的区域。

光合作用的光反应中所形成的ATP和NADPH则用于将 $CO_2$ 转变成六碳糖和其它有机化合物。光合作用的暗阶段称为卡尔文循环，其起点是 $CO_2$ 与核酮糖1,5-二磷酸反应形成两分子3-磷酸甘油酸。3-磷酸甘油酸转变为果糖6-磷酸和葡萄糖6-磷酸的各个步骤和葡糖异生作用的一样，只是叶绿体中的甘油醛3-磷酸脱氢酶对NADPH专一而不是对NADH专一。果糖6-磷酸、甘油醛3-磷酸和二羟丙酮磷酸又通过一系列复杂的反应再生核酮糖二磷酸。核酮糖1,5-二磷酸的再生中有几个步骤和戊糖磷酸途径中的一样。 $CO_2$ 转变为六碳糖消耗三个ATP和两个NADPH。光系统I吸收四个光子，光系统II吸收另外四个光子以产生两个NADPH。

热带植物有一种辅助途径将 $CO_2$ 集中在卡尔文循环的部位上。这种 $C_4$ 途径使得热带植物在高光水平下占优势，并且削弱了核酮糖1,5-二磷酸的加氧作用——一种竞争性反应。

## 习 题

1. 计算FRS还原 $\text{NADP}^+$ 的 $\Delta E_0'$ 和 $\Delta G^{\circ'}$ 。
2. 景天庚酮糖1,7-二磷酸是卡尔文循环的中间产物而不是戊糖磷酸途径的中间产物。这种差别的酶学基础是什么?
3. 假设照着光的小球藻悬液正在活跃地进行光合作用而光突然被关掉。在下一分钟内3-磷酸甘油酸和核酮糖1,5-二磷酸的水平将如何变化?
4. 假设照着光的小球藻悬液正在1%  $\text{CO}_2$ 中活跃地进行光合作用而 $\text{CO}_2$ 突然减少为0.003%。在下一分钟内这种变化会对3-磷酸甘油酸和核酮糖1,5-二磷酸的水平发生什么影响?
5. 蓝绿藻的光合器官中除叶绿素 $a$ 外还含有大量的藻红素和藻蓝素。藻红素的最高吸收在480和600nm之间,而藻蓝素的最高吸收靠近620nm。试指出这些辅助光合色素的作用。
6. 高等植物光合作用的范·尼尔方程式为:



(a)  $\text{H}_2\text{O}$  在方程式的两侧出现。这仅仅是一种写法还是它表达了光合机理的一个重要方面?

(b) 呼吸作用的传统方程式是:



范·尼尔方程式(倒过来写)是否更能说明呼吸作用的机理?换言之,葡萄糖的燃烧是否需要加入六分子的 $\text{H}_2\text{O}$ ?

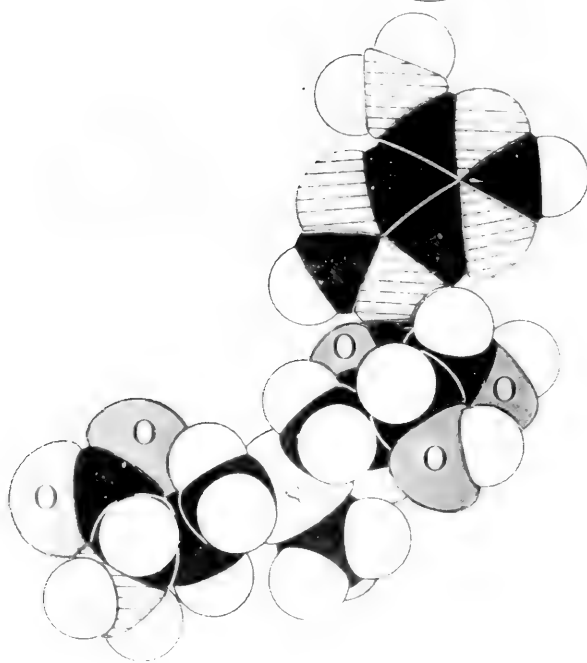
7. 不加ADP和 $\text{P}_i$ 的情况下照光的叶绿体在随后的暗阶段中加入ADP和 $\text{P}_i$ 就形成ATP。若在照光之前加入吡啶则在暗中合成的ATP的量显著增加。为什么?
8. 一种除草剂二氯苯基二甲基脲(DCMU)在没有加入人工的电子受体时会干扰光合磷酸化和氧的释放。但是,它不抑制希尔反应。试指出DCMU抑制作用的部位。

另外的习题参看 W. B. Wood, J. H. Wilson, R. J. Benbow, and L. E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 12.

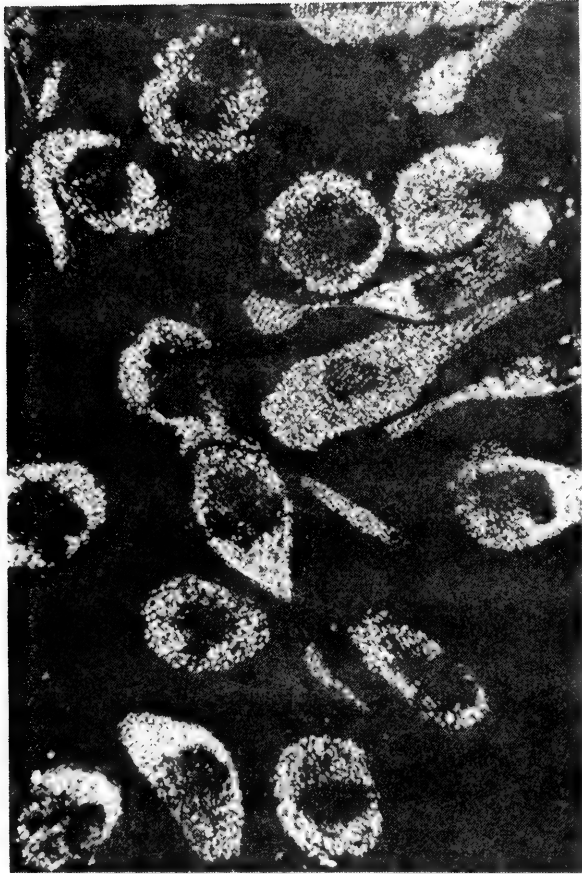


# 第三篇 大分子前体的生物合成

(顾孝诚 译, 吴相钰 校)



S-腺苷甲硫氨酸的模型，它是许多生物合成中的甲基供体。



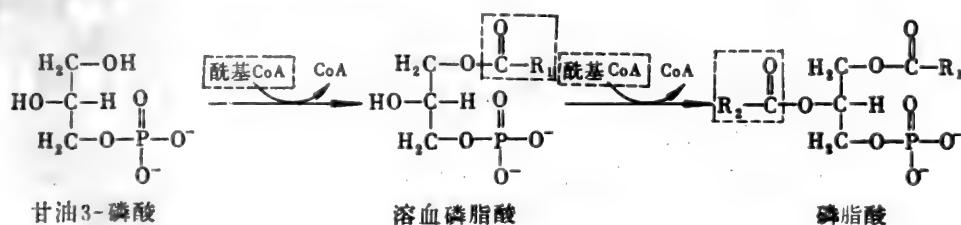
巨噬细胞的偏光显微镜照相，细胞内含有胆固醇酯的双折射晶体。〔蒙Dr. Richard Anderson 特  
许。〕

## 第20章 膜脂和甾类激素的生物合成

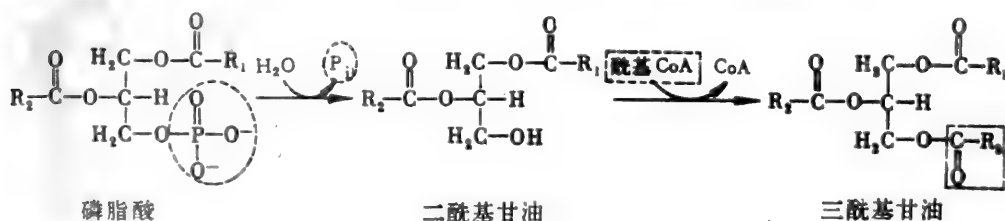
现在我们从代谢能量的产生问题转向大分子前体及相关生物分子的生物合成。本章论述磷酸甘油酯、鞘脂和胆固醇的生物合成，这三类物质是生物膜的重要组分（第十章）。三酰基甘油的合成也在这里考虑，因为这个途径与磷酸甘油酯的合成途径相交；甾类激素的形成也在这里提出，因为它们是从胆固醇演变来的。胆固醇的生物合成是一个范例，可以说明从5碳单位组成延长的碳链骨架的基本机制。

### 磷脂酸是磷酸甘油酯合成和三酰基甘油合成的中间产物

磷脂酸（二酰基甘油3-磷酸）是磷酸甘油酯合成和三酰基甘油合成中的一个共同中间产物。起始物是甘油3-磷酸，它主要是由二羟丙酮磷酸还原而成的，少量是由甘油的磷酸化产生的。甘油3-磷酸被酰基CoA酰化，形成溶血磷脂酸，溶血磷脂酸再由酰基CoA酰化，产生磷脂酸。这些酰化作用是由甘油磷酸酰基转移酶催化的。



两条途径从磷脂酸分道。在三酰基甘油的合成中，磷脂酸被专一性的磷酸酶所水解，形成二酰基甘油。在一个由甘油二酯酰基转移酶催化的反应中，二酰基甘油这个中间产物被酰化成三酰基甘油。这些酶组合在一个结合在膜上的三酰基甘油合成酶复合物内。



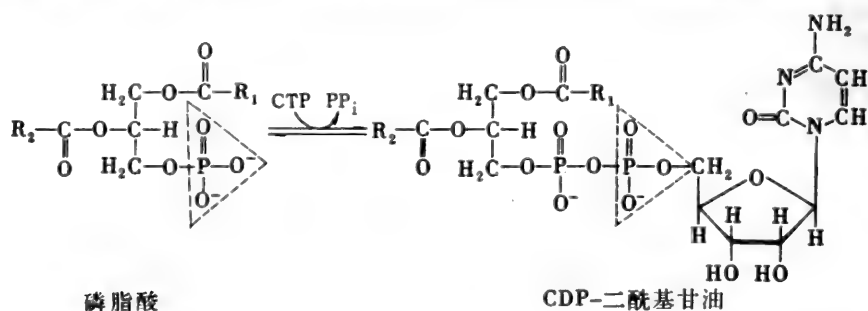
合成代谢——生物合成的过程。

降解代谢——降解的过程。

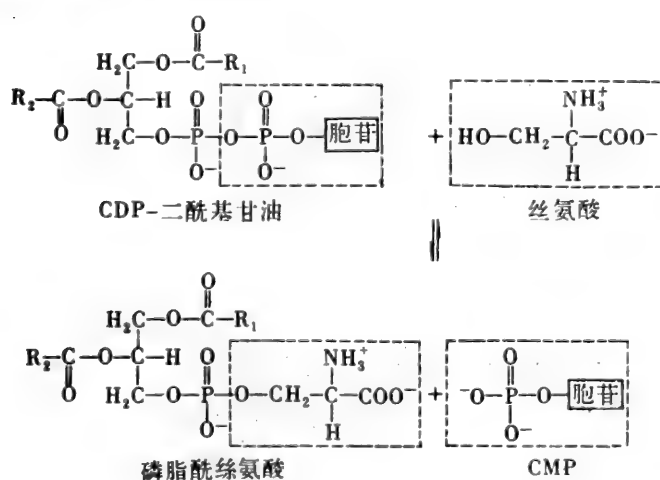
## CDP-二酰基甘油是磷酸甘油酯

### 从头合成中的活化中间产物

磷酸甘油酯的合成有若干条路线。从头开始的合成途径以磷脂酸和胞苷三磷酸 (CTP) 形成胞苷二磷酸二酰基甘油 (CDP-二酰基甘油) 为起点。该反应由焦磷酸的水解作用向前驱动。



活化的磷脂酰单位再与一个极性醇的羟基反应。当极性醇为丝氨酸时，产物为磷脂酰丝氨酸和胞苷一磷酸 (CMP)。



因此，胞苷酸在磷酸甘油酯合成中所起的作用，正如尿苷酸在糖原合成中所起的作用一样。在两个生物合成中，都从一个磷酸化的底物 (葡萄糖1-磷酸或磷脂酸) 和一个核苷三磷酸 (UTP或CTP) 形成一个活化的中间产物 (UDP-葡萄糖或CDP-二酰基甘油)。然后该活化的中间产物再和一个羟基 (糖原的4-OH端或丝氨酸的羟基侧链) 反应 (图20-1)。

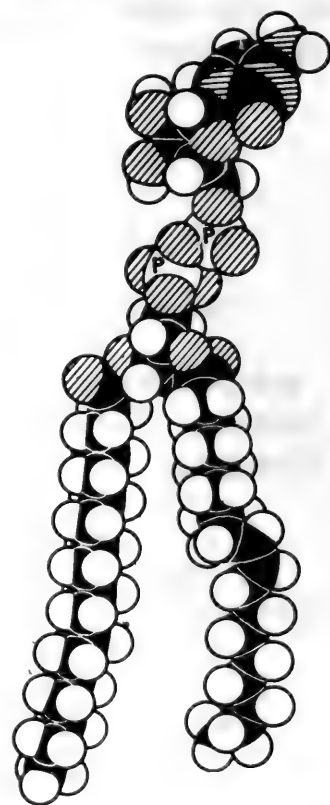
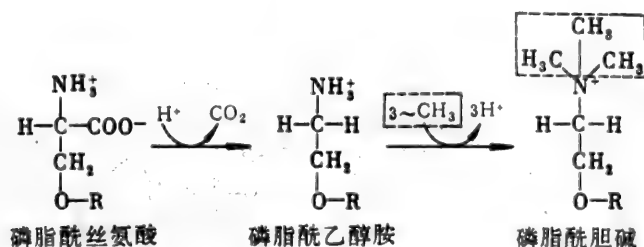


图20-1 CDP-二酰基甘油的空间填充模型。

磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱可以从磷脂酰丝氨酸形成

在吡哆醛磷酸酶的作用下，磷脂酰丝氨酸脱去羧基，产生磷脂酰乙醇胺。然后，这个磷酸甘油酯的氨基再经三次甲基化，形成磷脂酰胆碱。**S-腺苷甲硫氨酸**是这个以及许多其它甲基化作用中的甲基供体，以后将予讨论（379页）。



磷酸甘油酯也可以通过补救途径来合成

磷脂酰胆碱也可以通过一个利用胆碱的途径来合成。因此，这些反应被称为补救途径。（图20-2）。

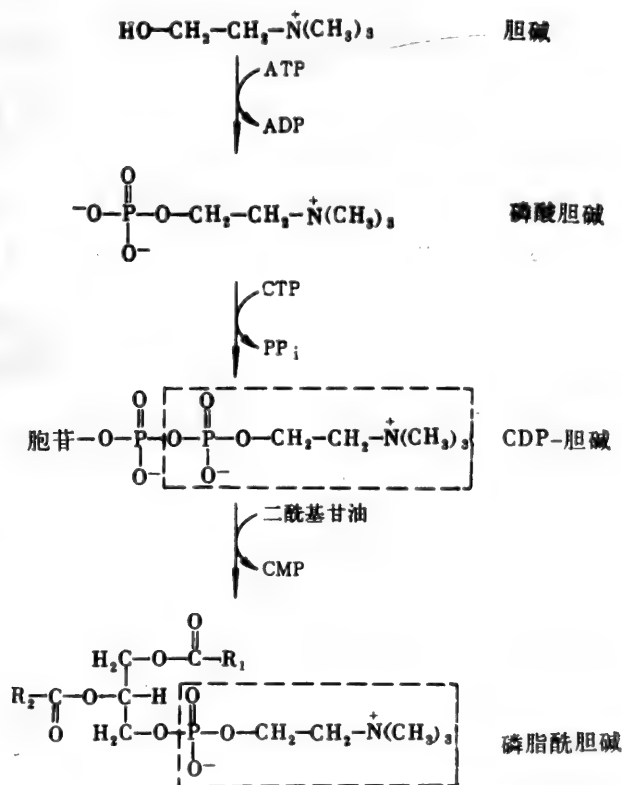
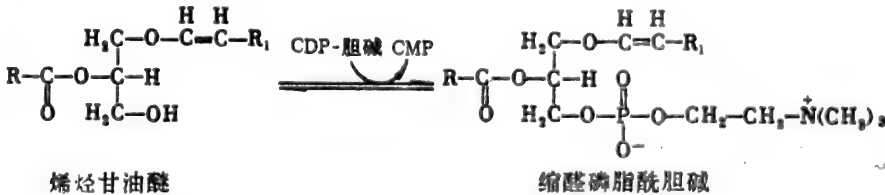


图20-2 通过补救途径合成磷脂酰胆碱。

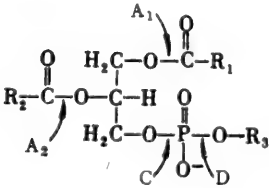
胆碱被ATP磷酸化成为磷酸胆碱，后者再与CTP反应，产生CDP-胆碱。然后CDP-胆碱的磷酸胆碱单位被转移到二酰基甘油上，形成磷脂酰胆碱。应当特别指出，在这个补救途径中，活化的化合物不是磷脂酸，而是磷酸胆碱的胞苷衍生物。

通过类似的反应，可以从乙醇胺合成磷脂酰乙醇胺。缩醛磷脂也是通过补救途径产生的。缩醛磷脂和磷酸甘油酯的差别，在于其甘油部分的C-1取代物为 $\alpha$ ， $\beta$ 不饱和醚。缩醛磷脂酰胆碱（对应于磷脂酰胆碱的缩醛磷脂）合成中的最后一步是磷酸胆碱从CDP-胆碱转移到烯基甘油醚上。



### 已经分离了若干专一性的磷脂酶

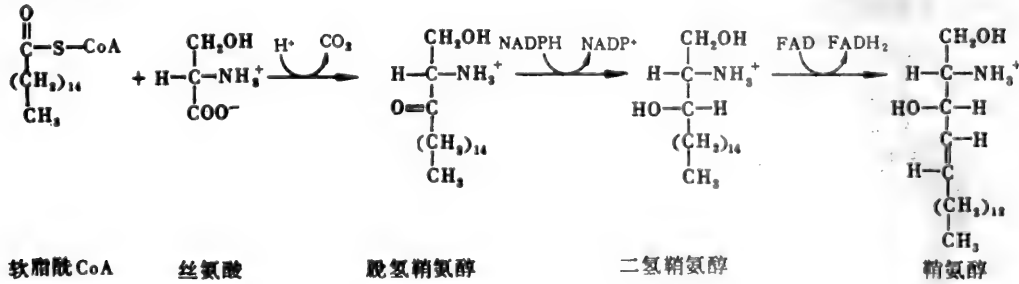
酶可以作为高度专一性的生化试剂来使用。例如，我们已经看到，胰蛋白酶是蛋白质结构研究中的宝贵工具。关于生物膜及其磷脂类成分的研究中，专一性的磷脂酶正在起着类似的重要作用。磷脂酶是按照它们的专一性来分组的。由磷脂酶A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、C和D水解的键示于图20-3。



### 鞘脂类的基本结构单元神经酰胺的合成

图20-3 磷脂酶的专一性。

我们现在从磷酸甘油酯转向鞘脂类。它们的骨架是鞘氨醇，而不是甘油。鞘氨醇是一个长链的脂肪胺。软脂酰CoA和丝氨酸缩合，形成脱氢鞘氨醇，后者再转变成鞘氨醇。



在所有的鞘脂类化合物中，鞘氨醇的氨基都是被酰化的（图10-4）。长链的酰基CoA与鞘氨醇反应，形成神经酰胺（N-酰基鞘氨醇）。在鞘脂类化合物中，末端的羟基也被取代。在鞘磷脂中，取代基为来自CDP-胆碱的磷酸胆碱。在脑苷脂中，葡萄糖或半乳糖与神经酰胺的末端羟基相连接。UDP-葡萄糖或UDP-半乳糖是脑苷脂类合成中的糖供体。在神经节苷脂中，寡糖通过一个葡萄糖残基与神经酰胺相连接（见图20-5）。

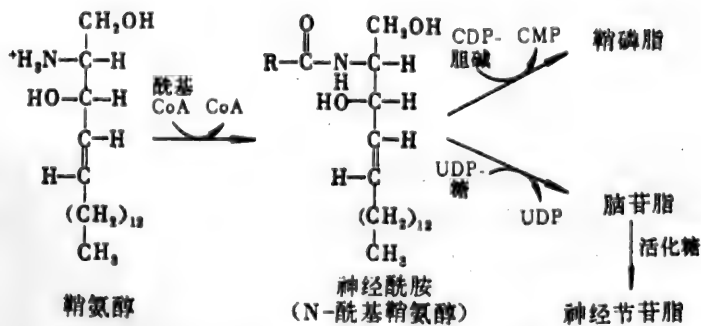


图20-4 神经酰胺是鞘磷脂和神经节苷脂的前体。

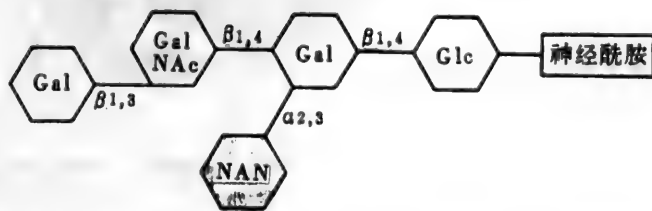


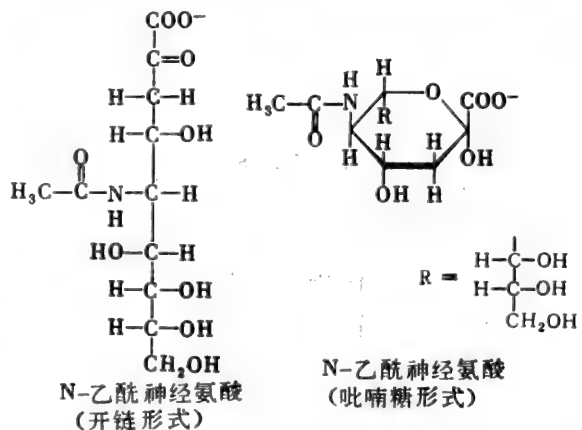
图20-5 神经节苷脂 $G_{M1}$ 的结构。使用的缩写符号：Gal，半乳糖；Gal NAc，N-乙酰半乳糖胺；Glc，葡萄糖；NAN，N-乙酰神经氨酸。两糖之间的连接方式——如 $\beta$ 1, 4——在连接两糖的键处注明。

### 神经节苷脂是富含糖类的含酸性糖的鞘脂

神经节苷脂是最复杂的鞘脂类化合物。与神经酰胺相连的寡糖链至少含有一个酸性糖。

酸性糖是N-乙酰神经氨酸或N-羟乙酰神经氨酸。这些酸性糖被称为唾液酸。它们的九个碳原子的骨架是由磷酸烯醇式丙酮酸（一个 $C_3$ 单位）和N-乙酰甘露糖胺6-磷酸（一个 $C_6$ 单位）合成的。

神经节苷脂是由糖残基依次逐步加到神经酰胺上去而合成的。UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖和UDP-N-乙酰半乳糖胺是这些糖残基的活化供体。N-乙酰神经氨酸的CMP衍生物是该酸性糖的活化供体。CMP-N-乙酰神经氨酸是由CTP和N-乙酰神经氨酸合成的；C-1是活化的碳，与UDP-糖中的情况相同。由此形成的神经节苷脂的结构决定于细胞中糖基转移酶的专一性。已经确认15种以上不同的神经节苷脂。神经节苷脂 $G_{M1}$ 的结构示于图20-5。



泰-萨二氏 (Tay-Sachs) 症：一种遗传性的神经节苷脂分解失调症

神经节苷脂在神经系统中的浓度最高，特别是在灰质中，它们占脂类的6%。神经节苷

脂通过它们的末端糖残基依次挪动而不断地合成和降解。催化这些反应的糖基水解酶有高度的专一性。神经节苷脂的分解在溶酶体内进行。这些细胞器含有许多类型的降解酶，并且专门用于有序地破坏细胞组成（图20-6）。

神经节苷脂分解失调可以引起严重的临床后果。泰-萨二氏症的症状通常在患儿不到一岁时就已明显可见。虚弱、发育迟缓和进食困难是典型的早期症状。通常在几个月后继续发生眼盲。一般在三岁以前泰-萨二氏症是致命的。该症的突出病理变化发生在神经系统，大脑皮层及脑的某些其它部分的神经节细胞肿胀很大。另外，在视网膜上有一个特殊的樱桃红色的斑点。

在泰-萨二氏症患儿的大脑中，神经节苷脂的含量大大升高。特别是神经节苷脂 $G_{M2}$ 的浓度比正常情况高出许多倍。该神经节苷脂的异常高水平是由于缺乏一种酶而引起的，这种酶可以除去神经节苷脂的末端N-乙酰半乳糖胺残基。这种缺少或有缺陷的酶是专一性的 $\beta$ -N-乙酰氨基糖苷酶。

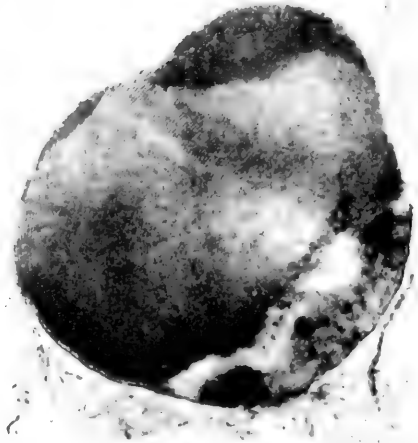
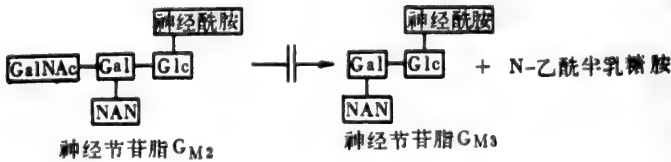


图20-6 一个溶酶体的电镜照片。[蒙Dr. George Palade 特许。]



泰-萨二氏症作为常染色体隐性因子而遗传。在犹太裔的美国人中载体率是1/30，在非犹太裔的美国人中是1/300。因此，在犹太裔的美国人中，该症的发病率要高出约100倍。在胚胎发育时期就可以诊断泰-萨二氏症。通过羊膜穿刺可以获得羊水，然后测定羊水中 $\beta$ -N-乙酰氨基糖苷酶的活性。

### 胆固醇是从乙酰辅酶A合成的

我们现在把注意力转向胆固醇的合成，它是一个调节真核细胞膜的流动性（227页）的甾类化合物（图20-7）。胆固醇也是甾类激素如黄体酮、睾酮、雌二醇和皮质醇的前体。布洛克（Konrad Bloch）在本世纪40年代的工作为胆固醇合成提供了早期的重要线索。他制备了同位素标记碳原子的乙酸，并用它饲喂大鼠。这些大鼠合成的胆固醇都含有同位素标记，这表明乙酸是胆固醇的前体。事实上，胆固醇的全部27个碳原子都起源于乙酰CoA。对胆固醇合成的进一步认识，来自使用标记乙酸做前体的研究工作，这种乙酸的甲基碳原子或羧基碳原子有同位素标记。用其中标记一个碳原子的乙酸合成胆固醇，把这种胆固醇分子降解之后，可以表明分子中每一个碳原子的来源（图20-8）。这种分布情况对于建立和检验胆固醇



合成途径的假说方面，起了关键性的作用。

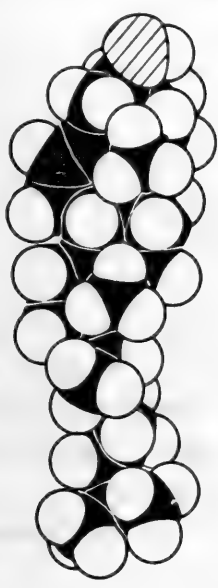


图 20-7 胆固醇的空间填充模型。

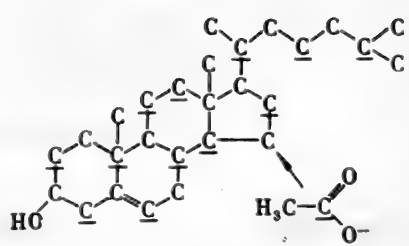
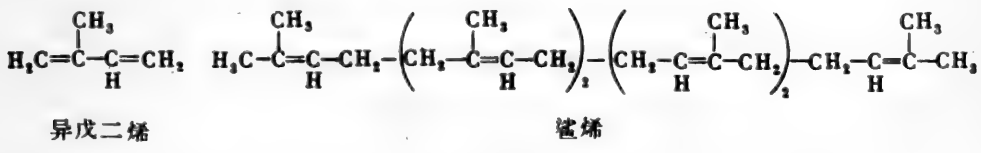


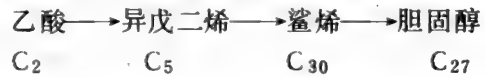
图 20-8 用同位素标记乙酸的甲基碳原子或羧基碳原子（C 下加线），图示由这两种标记乙酸所合成的胆固醇分子中，同位素标记的分布情况。

### 甲羟戊酸和鲨烯是胆固醇合成的中间产物

下一个主要线索来自一项发现，即鲨烯——一个C<sub>30</sub>的烃类化合物——是胆固醇合成的中间产物。鲨烯由六个异戊二烯单位组成。

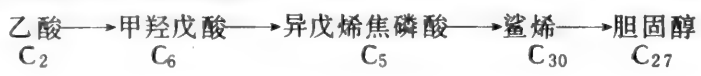


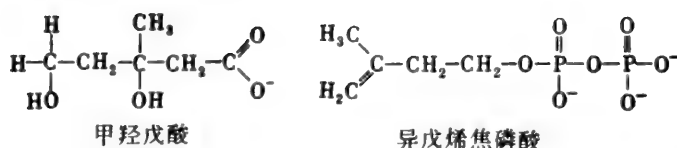
这个发现提出了一个问题，即异戊二烯单位是如何从乙酸形成的。



出人意料之外，对这个问题的回答竟然来自与此无关的关于细菌突变种的研究。人们发现，甲羟戊酸可以代替乙酸，满足要求乙酸的突变物的营养需要。

在阐明胆固醇生物合成途径方面，甲羟戊酸的发现是一个关键性的步骤，因为此后人们很快地认识到，这个C<sub>6</sub>酸可以脱羧基，产生设想中的C<sub>5</sub>异戊二烯中间产物。在此之后，同位素标记研究表明，甲羟戊酸果然真是鲨烯的前体，而且它可以从乙酸形成。活化的异戊二烯中间产物被证明是异戊烯焦磷酸，而异戊烯焦磷酸是由甲羟戊酸衍生物脱羧基形成的。于是从乙酸合成胆固醇的途径可以概括如下：





## 异戊烯焦磷酸——胆固醇形成过程中 的一个活化中间产物——的合成

胆固醇合成的第一个阶段，是从乙酰CoA形成异戊烯焦磷酸。这一套反应从乙酰CoA和乙酰乙酰CoA形成3-羟基-3-甲基戊二酰CoA开始。在关于酮体的形成方面（300页），以前曾讨论过3-羟基-3-甲基戊二酰CoA的一种命运，它裂解为乙酰CoA和乙酰乙酸。另一种命运是，3-羟基-3-甲基戊二酰CoA可以还原为甲羟戊酸（图20-9）。3-羟基-3-甲基戊二酰CoA同时存在于肝细胞胞液和线粒体里。胞这个中间产物的线粒体池主要是酮

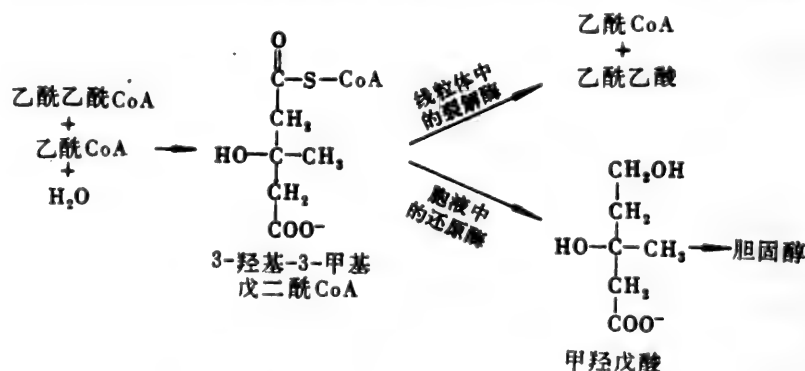


图20-9 3-羟基-3-甲基戊二酰CoA的合成和命运。

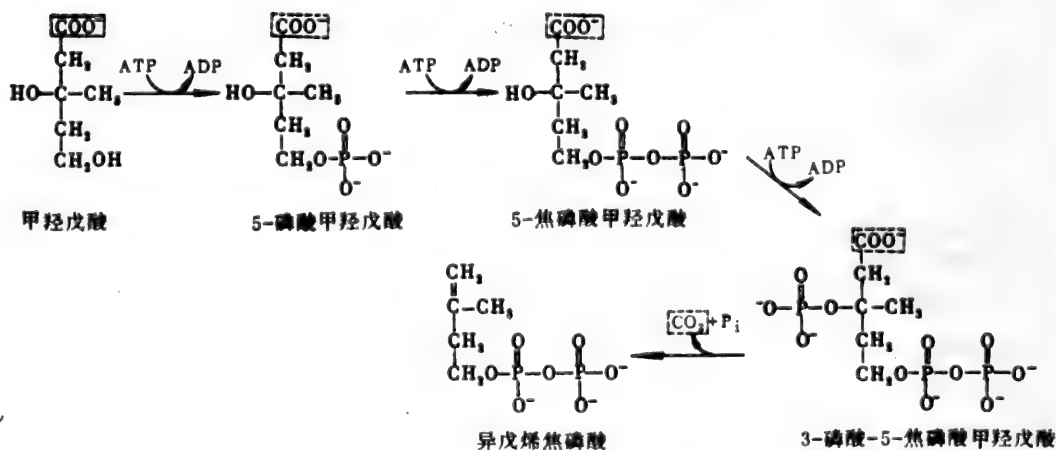


图20-10 从甲羟戊酸合成异戊烯焦磷酸。

体的前体，而细胞质池则产生甲羟戊酸，以供合成胆固醇用。

在胆固醇的形成中，甲羟戊酸的合成是关键步骤。催化这个不可逆步骤的酶是3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶，它在胆固醇生物合成中是一个重要的控制部位，后面不久将会讨论到。



甲羟戊酸通过三次连续的磷酸化作用转变为3-磷酸-5-焦磷酸甲羟戊酸。这个不稳定的中间产物失去 $\text{CO}_2$ 和 $\text{P}_i$ ，产生3-异戊烯焦磷酸（图20-10）。

### 从异戊烯焦磷酸合成鲨烯

鲨烯是按照下列反应顺序从异戊烯焦磷酸合成的：



胆固醇合成中的这个阶段（图20-11）是从异戊烯焦磷酸异构化为二甲基丙烯焦磷酸开始的。

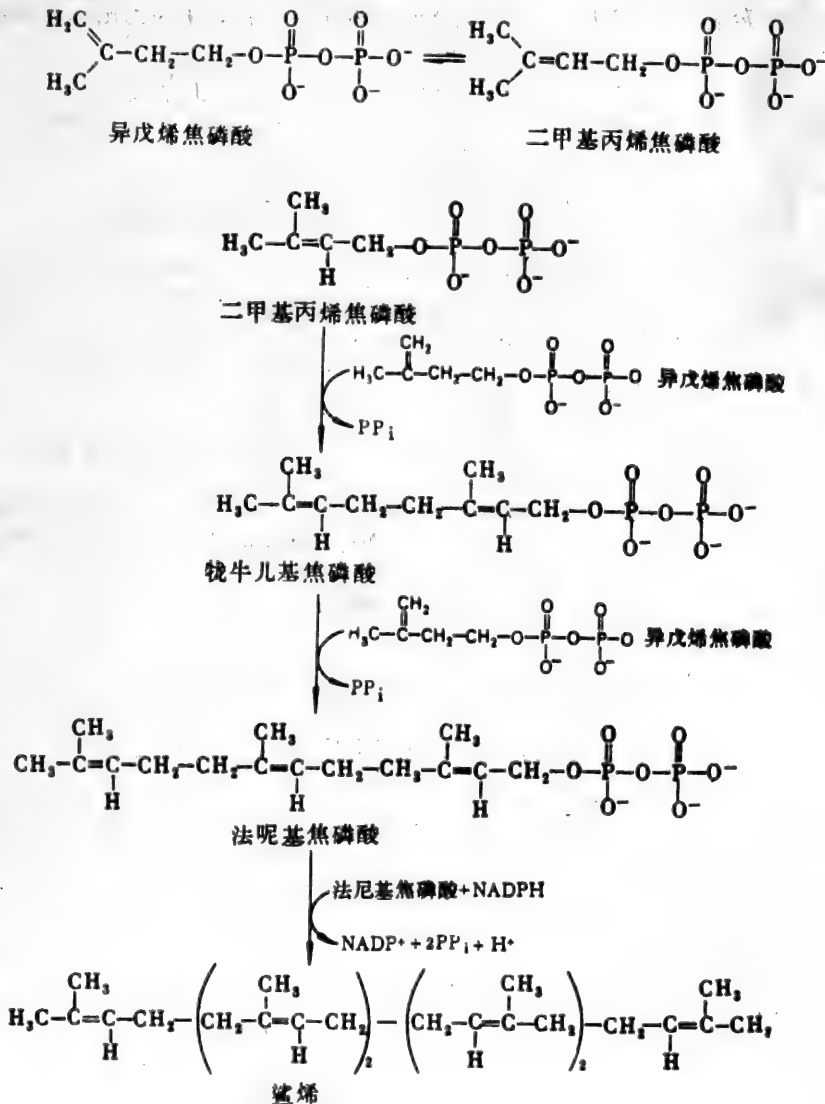


图20-11 从二甲基丙烯焦磷酸合成鲨烯，二甲基丙烯焦磷酸是异戊烯焦磷酸的异构物。

这两个C<sub>5</sub>单位缩合，产生牻牛儿基焦磷酸(C<sub>10</sub>)，牻牛儿基焦磷酸再与另一分子的异戊烯焦磷酸缩合，形成法呢基焦磷酸(C<sub>15</sub>)(图20-12，图20-13)。鲨烯合成的最后一步是二分子的法呢基焦磷酸的还原性缩合：

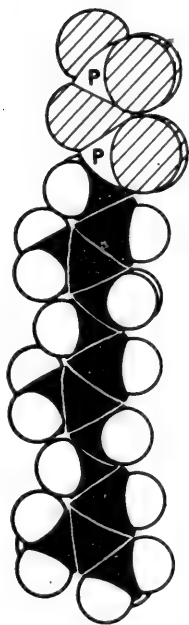
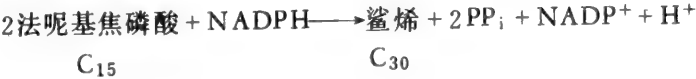


图20-12 法呢基焦磷酸的空间填充模型。

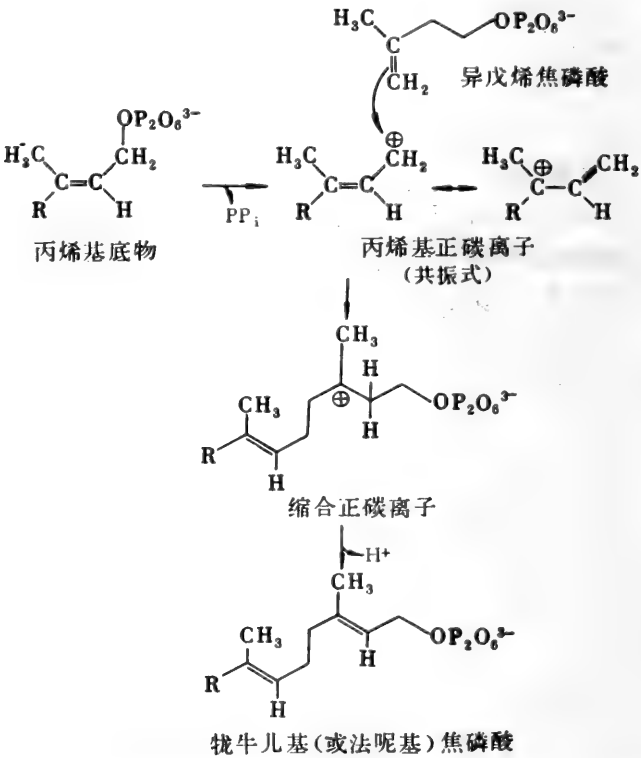


图20-13 异戊烯焦磷酸与一个丙烯基底物（如二甲基丙烯焦磷酸或牻牛儿基焦磷酸）头尾相接的设想机制。三个步骤是电离、缩合和消除。

### 环氧鲨烯环化成羊毛甾醇，羊毛甾醇再转化为胆固醇

胆固醇生物合成的最后阶段始自鲨烯的环化（图20-14）。与以前的步骤相反，胆固醇生物合成的这个阶段需要氧分子。活泼的中间产物环氧鲨烯在一个消耗O<sub>2</sub>和NADPH的反应中形成。环氧鲨烯继而由一个环化酶环化，成为羊毛甾酸。在这个非凡的闭合反应中，有电子协同移动通过四个双键，还有两个甲基移位。最后，通过除去三个甲基，由NADPH还原一个双键，以及另一个双键的移位，羊毛甾醇转变为胆固醇。指出这一点是有趣的，即只在地球的大气层变得含氧之后，胆固醇才出现。胆固醇在真核生物中是普遍存在的，但在大多数原核生物中都不存在。

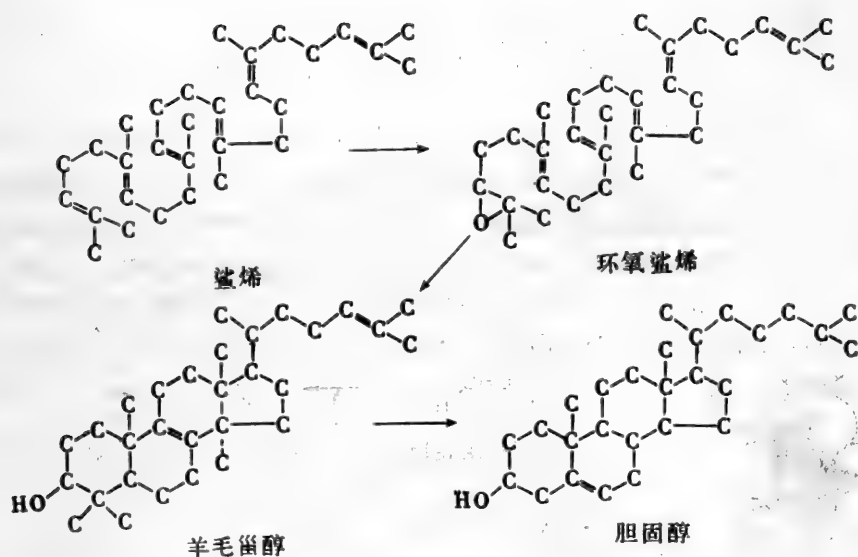


图20-14 从鲨烯合成胆固醇。

## 从胆固醇演变出来的胆汁盐促进脂类的消化

胆汁盐是胆固醇的极性衍生物。这些化合物是高效去垢剂，因为它们含有极性区和非极性区。胆汁盐在肝脏中合成，在胆囊中储存和浓缩，然后释放入小肠。胆汁盐是胆汁的主要

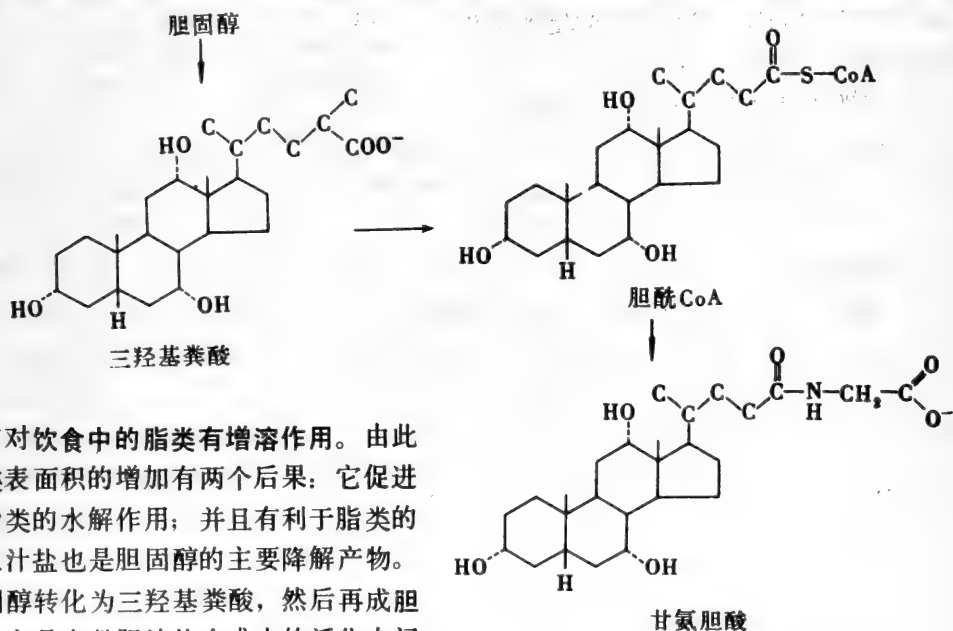


图20-15 主要胆汁盐甘氨酸胆酸的合成。

成分，它对饮食中的脂类有增溶作用。由此造成脂类表面积的增加有两个后果：它促进脂酶对脂类的水解作用；并且有利于脂类的吸收。胆汁盐也是胆固醇的主要降解产物。

胆固醇转化为三羟基羧酸，然后再成胆酰CoA，它是多数胆汁盐合成中的活化中间产物（图20-15）。胆酰CoA的活化羧基碳原子再与甘氨酸的氨基反应，形成甘氨酸胆酸，或者与牛磺酸( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ )的氨基反应形成牛磺胆酸。甘氨酸胆酸是主要的胆汁盐。

## 肝脏中合成胆固醇的作用受食物中胆固醇的抑制

胆固醇可以从饮食中摄取，或者也可以从头合成。哺乳类动物的胆固醇主要在肝脏中合成。肠也能合成数量可观的胆固醇。成年人吃胆固醇含量低的食物时，每天典型地能合成约800mg胆固醇。这些器官制造胆固醇的速度，对取自食物的胆固醇的数量，有高度的敏感性。这个反馈控制是由3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶活力的改变来调节的。前面已经讨论过，3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶催化甲羟戊酸的形成，而这是胆固醇生物合成的关键步骤。饮食中的胆固醇抑制肝脏内还原酶的合成作用，并使已经存在的酶分子失活。

## 胆固醇和其它脂类都由一系列的 脂蛋白运往特殊的靶

胆固醇、三酰基甘油及其它脂类在体液中由一系列的脂蛋白运输，脂蛋白按密度大小分类（表20-1），从小到大有：乳糜微粒，极低密度脂蛋白（VLDL），低密度脂蛋白（LDL），和高密度脂蛋白（HDL）。这些脂蛋白由疏水脂类构成核心，外面包以极性脂类，然后再包上一层脱辅基蛋白外壳。目前已分离并鉴定了八类脱辅基蛋白：apoA-1，A-II，B，C-I，C-II，C-III，D和E。这些复合物使高度疏水的脂类增溶。此外，它们的蛋白质组分含有信号，可以调节特殊脂类在特殊的靶处出入。

表20-1 血浆脂蛋白

类 型	密度 (g/cm <sup>3</sup> )	主要多肽
乳糜微粒	<0.94	apoA, B, C
极低密度脂蛋白 (VLDL)	0.940—1.006	apoB, C, E
低密度脂蛋白 (LDL)	1.006—1.063	apoB
高密度脂蛋白 (HDL)	1.063—1.210	apoA

血浆脂蛋白是由肝脏和肠合成并分泌的。乳糜微粒是最大的脂蛋白，它们把饮食中的三酰基甘油、胆固醇及其它脂类从肠运输到脂肪组织和肝。它们的密度很低(<0.94g/cm<sup>3</sup>)，因为它们富含三酰基甘油，而且蛋白质含量少于2%。乳糜微粒中的三酰基甘油在几分钟内就可以被脂肪酶水解，这些酶位于脂肪组织和其它外周组织的微血管内。富含胆固醇的残余物称为剩余颗粒，它们由肝脏吸收。极低密度脂蛋白主要由肝合成。VLDL把内源合成的三酰基甘油运送到脂肪组织。残余部分转化为低密度脂蛋白，它们是富含胆固醇酯的。LDL内大部分的胆固醇酯化为亚油酸，亚油酸是一个高度不饱和的脂肪酸。LDL的作用是把胆固醇运输到外周组织，并在这些地方调节胆固醇的从头合成，后面不久即将讨论到这个内容。高密度脂蛋白由肝合成，它们富含磷脂和胆固醇。HDL的一个作用是把胆固醇从外周组织运送到肝。

## 低密度脂蛋白受体在控制胆固醇 代谢方面起关键性作用

胆固醇是一切真核生物质膜的组分，它对高等生物的细胞生长和生活力都是必需的。但

是，胆固醇过多可致命，因为胆固醇酯空斑的沉积引起动脉粥样硬化。很明显，胆固醇代谢必须是精确调节的。我们已经讨论过了肝脏中的控制方式，肝是胆固醇合成的主要部位。饮食胆固醇使3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶的活力降低，数量减少，而该酶催化这一关键步骤。布朗，M. (Michael Brown)和戈尔德斯泰因，J. (Joseph Goldstein)关于人成纤维细胞培养的研究，使人们认识了非肝细胞内胆固醇代谢的控制。一般地说，肝和肠以外的细胞从血浆获得胆固醇，而不是从头合成胆固醇。明确地，它们的主要胆固醇来源是低密度脂蛋白。通过LDL途径吸收胆固醇的步骤是：

1. LDL与非肝细胞质膜上的专一性受体相结合。LDL受体位于特化的区域，这种区域称为被膜小坑，它们含有包涵素（561页）。

2. 受体-LDL复合物由内吞作用而内在化——也就是说，邻近复合物的质膜凹陷，然后再融合，形成一个内吞泡囊（图20-16，图20-17）。

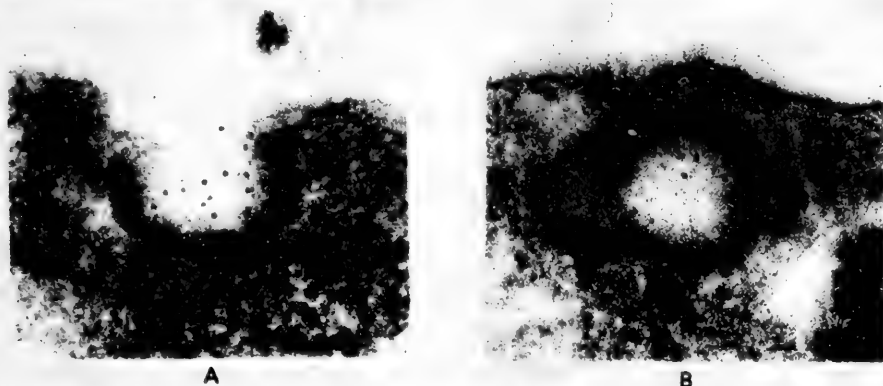


图20-16 LDL的内吞作用，LDL与培养的人成纤维细胞表面的受体相结合（把LDL与铁蛋白结合，使LDL可见）；(A)电镜显微照相，示LDL-铁蛋白（黑点）和在细胞表面的被膜小坑相结合；(B)该区凹陷后再融合，形成一个内吞泡囊。[取自R. G. W. Anderson, M. S. Brown和J. L. Goldstein, *Cell* 10 (1977): 351. MIT出版社。]

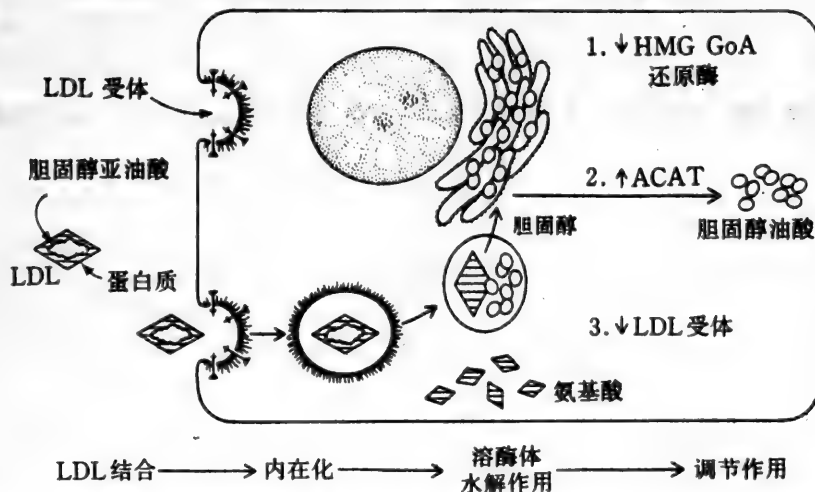


图20-17 培养的人成纤维细胞中低密度脂蛋白途径的步骤。HMGCoA还原酶表示3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶，ACAT表示酰基CoA：胆固醇酰基转移酶。[依据Dr. Michael Brown和Dr. Joseph Goldstein惠赠的图。]

3. 这些含有LDL的泡囊继而与溶酶体融合,溶酶体带有大量的各种降解酶。LDL的蛋白质组分被水解成游离氨基酸。LDL中的胆固醇酯被溶酶体的酸性脂酶水解。

4. 在此之后被释放的未酯化的胆固醇可以用于膜的生物合成。或者另一条路线是它可以重新酯化,在细胞内储存。事实上,自由的胆固醇使酰基CoA-胆固醇酰基转移酶(ACAT)活化,该酶催化这个反应。重新酯化的胆固醇主要含有油酸和棕榈油酸,它们是含有一个不饱和键的脂肪酸,与LDL中的胆固醇酯不同,因为后者富含亚油酸,而亚油酸是具有多个不饱和键的脂肪酸。

具有活跃的LDL途径的细胞的胆固醇含量通过两种方法来调节。第一种方法是释放的胆固醇压低3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶的形成,从而抑制胆固醇的从头合成。第二种方法是LDL受体本身受反馈调节的支配。在成纤维细胞中,LDL受体的半衰期约为一天。当细胞内有丰富的胆固醇存在时,新的LDL受体不再合成,因而从血浆LDL吸取更多胆固醇的作用被阻断。

### 缺少LDL受体引起高胆固醇血症和 过早发生的动脉粥样硬化

关于家族性高胆固醇血症的研究突出了LDL受体的重要性。在这种遗传性的疾病中,血浆里LDL和胆固醇的总浓度显著升高,这是由于在一个单个的常染色体位置发生突变的结果。纯合子血浆内胆固醇的典型水平为680mg/dl,相比之下,在杂合子中为300 mg/dl,而正常人的为175mg/dl。由于血浆中LDL-胆固醇的浓度高,胆固醇在各种组织中沉积。胆固醇的结节称为黄瘤,在皮肤和腱中很突出。更为有害的是胆固醇沉积成动脉空斑,而动脉空斑产生动脉粥样硬化。事实上,多数纯合子在童年时期就死于冠状动脉疾病。杂合子所患的疾病在临床上有更为多变和温和的过程。家族性高胆固醇血症患者的分子缺陷是不具备或缺乏功能完善的LDL受体。纯合子几乎没有LDL受体,而杂合子的LDL受体约相当于正常数目的一半。因而减少了LDL进入非肝脏细胞,使血浆的LDL水平升高。家族性高胆固醇血症也可以由于LDL-受体复合物的内在化有缺陷而引起。

### 甾类的命名法

在转向讨论甾类激素的合成以前,对甾类的命名法稍加解说是适当的。甾类碳原子的编号

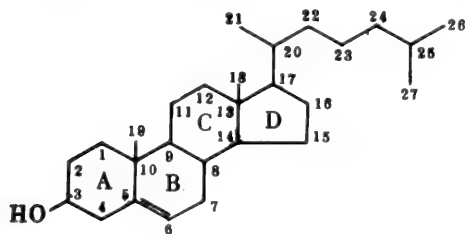
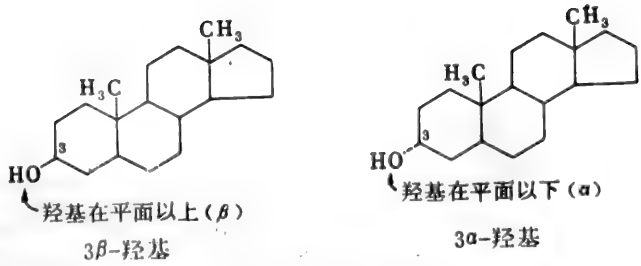


图20-18 胆固醇碳原子的编号。

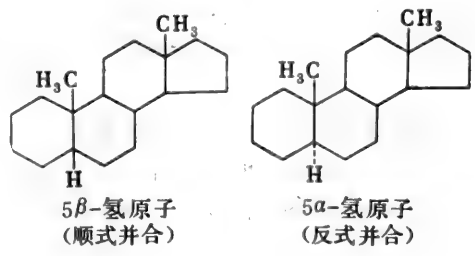
号示如图20-18中胆固醇的情况。甾类中的环被称为A, B, C和D,胆固醇含有两个角上甲基: C-19甲基连在C-10上, C-18甲基连在C-13上。C-10或C-13上的直线代表甲基。根据定义,胆固醇的C-18和C-19两个甲基位于四个环所在平面之上。在平面以上的取代基团称为 $\beta$ 取向,并用实线键表示。相反,位于平面之下的取代基团是 $\alpha$ 取向的,并用虚线或点



线表示。



连在C-5上的氢原子可以是 $\alpha$ 取向的,也可以是 $\beta$ 取向的。当这个氢原子是 $\alpha$ 取向时, A环和B环是以反式构象并合,而 $\beta$ 取向产生顺式并合。如果C-5氢原子没有符号,就意味着是反式并合。所有在该位置上含有氢原子的甾类激素中, C-5氢原子都是 $\alpha$ 取向的。与此相反,胆汁盐在C-5处有 $\beta$ 取向的氢原子。因此,顺式并合是胆汁盐的特征,而反式并合是所有在C-5有氢原子的甾类激素的特征。反式并合产生一个近乎平面的结构,而顺式并合造成弯曲的结构。



甾类激素是由胆固醇演化而来的

胆固醇是五种主要甾类激素的前体: 孕激素, 糖皮质激素, 盐皮质激素, 雄激素和雌激素(图20-19)。黄体酮是一种孕激素, 它使子宫内膜准备好, 便于卵子着生。黄体酮对于维持怀孕也是必要的。雄激素(如睾酮)负责雄性第二性征的发育, 而雌激素(如雌酮)则为雌性第二性征的发育所必需。雌激素也参加卵巢周期的活动。糖皮质激素(如皮质醇)促进糖原异生作用及糖原的形成, 还加强脂肪和蛋白质的降解。盐皮质激素(如醛固酮)使肾脏增加对 $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , 和 $\text{HCO}_3^-$ 的重新吸收, 这导致血液体积和血压的增加。这几类激素的主要合成部位是: 孕激素, 黄体; 雌激素, 卵巢; 雄激素, 睾丸; 糖皮质激素和盐皮质激素

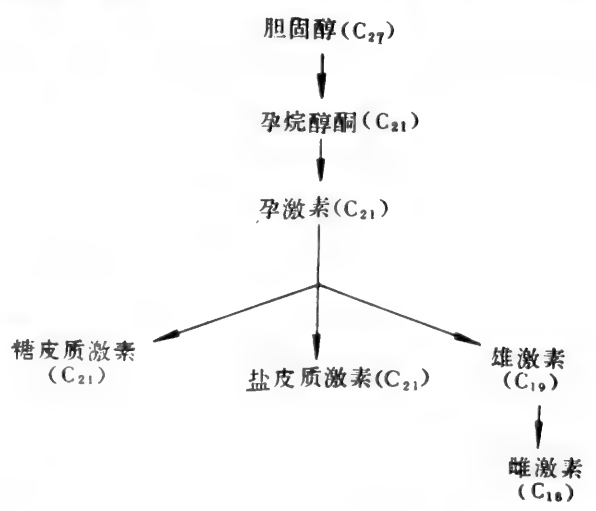
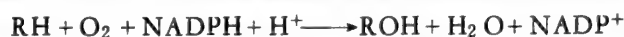


图20-19 甾类激素的生物合成关系。

素，肾上腺皮质。

### 甾类由利用NADPH和O<sub>2</sub>的单加氧酶羟化

羟化反应在从鲨烯合成胆固醇的过程中起非常重要的作用，在胆固醇转变为甾类激素和胆汁盐的反应中也起极重要的作用。所有这些羟化作用都需要NADPH和O<sub>2</sub>。掺入羟基中的氧原子来自O<sub>2</sub>，而不是来自H<sub>2</sub>O，这已通过使用<sup>18</sup>O标记的O<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O得到证明。O<sub>2</sub>分子中的一个氧原子进入底物，而另一个氧原子则被还原为水。催化这些反应的酶称为单加氧酶（或混合功能加氧酶）。请回忆，单加氧酶也参加苯丙氨酸的羟化作用（324页）。

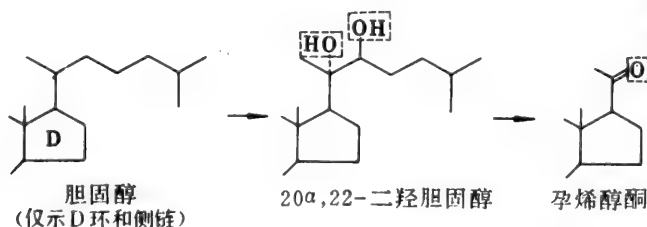


羟化反应需要氧的活化。在甾类激素和胆汁盐的合成中，活化作用是通过一个特化的细胞色素来完成的，这个细胞色素称为P<sub>450</sub>，因为它与CO的复合物在450 nm处有最大的吸收。细胞色素P<sub>450</sub>是一个电子传递链的末端组分，这条链在肾上腺线粒体和肝脏的微体中曾有发现。这种组装作用的任务是羟化，而不是氧化磷酸化。NADPH把它的高电势电子转移到本链的一个黄素蛋白中，这些电子然后再转送到皮质铁氧还蛋白，后者是一个非血红素铁的蛋白。皮质铁氧还蛋白把一个电子转移到氧化型的细胞色素P<sub>450</sub>。然后还原型的P<sub>450</sub>使O<sub>2</sub>活化。

细胞色素P<sub>450</sub>系统对外源物资（异生化合物）的解毒作用也是非常重要的。例如，羟化作用使苯巴比妥（一种巴比妥盐）的溶解度增加，并促使它被排出体外。同样，多环芳香烃也可被P<sub>450</sub>系统所羟化。羟基的引入为高度极性单位（如葡萄糖醛酸或硫酸盐）的结合提供反应部位，这样可以使经过改变的芳香化合物分子的溶解度显著提高。但是，P<sub>450</sub>系统的作用也不都是有益的。最近的研究表明，最强烈的致癌物质在活体内转化为化学上活跃的类型，而这个代谢活化的过程通常是由P<sub>450</sub>系统实现的。

### 孕烯醇酮通过胆固醇的侧链裂解作用而形成

甾类激素含有21个或更少的碳原子，而胆固醇含有27个碳原子。甾类激素合成的第一个阶段是从胆固醇的侧链上除去一个C<sub>6</sub>单位，以形成孕烯醇酮。胆固醇的侧链先在C-20处羟化，然后在C-22处羟化，随后在C-20和C-22之间断键。后面这个反应由碳链裂解酶催化。全部三个反应都利用NADPH和O<sub>2</sub>。促肾上腺皮质激素（ACTH，或促肾上腺皮质激素）



是由前脑下垂体合成的多肽，它刺激胆固醇转化为孕烯醇酮，后者是一切甾类激素的前体。

## 黄体酮和类皮质激素的合成

黄体酮是通过两步反应从孕烯醇酮合成的（图20-20）。孕烯醇酮的3-羟基被氧化成

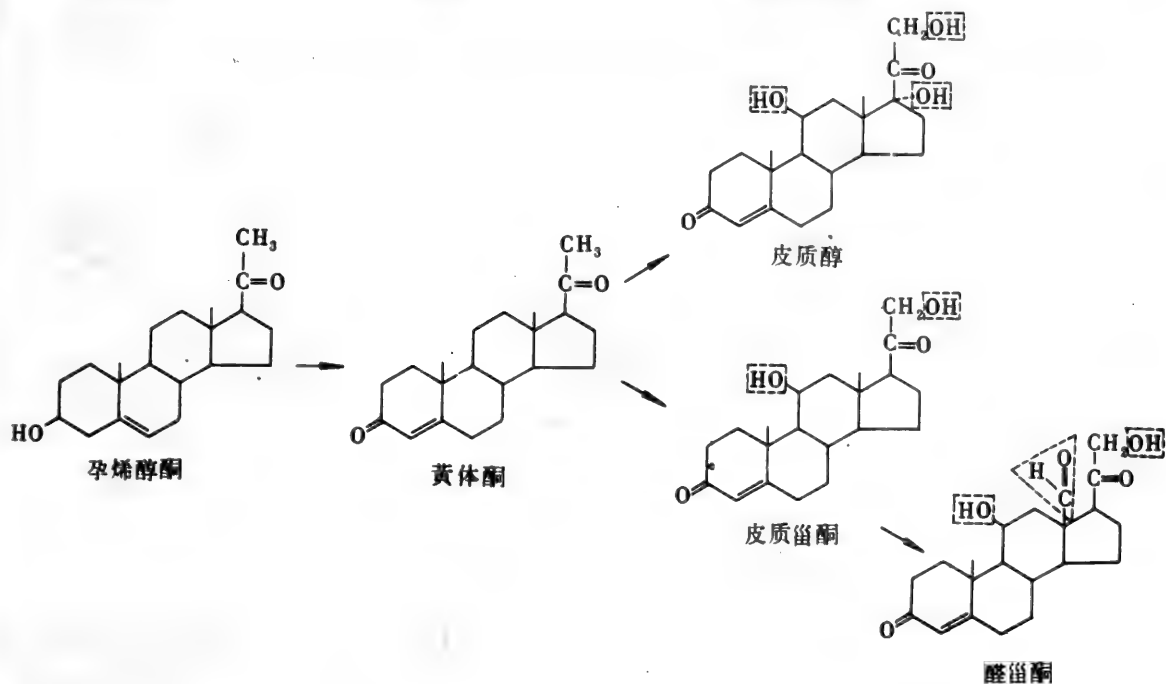


图20-20 黄体酮和类皮质激素的合成。

3-酮基，而 $\Delta^5$ 双键异构化成为 $\Delta^4$ 双键。皮质醇是主要的糖皮质激素，它是由黄体酮在C-17，C-21和C-11处羟化而合成的；C-17必须比C-21先羟化，而在C-11处的羟化作用则可在任意阶段发生。催化这些羟化作用的酶非常专一，这已为甾类代谢方面的某些遗传性紊乱所证明。醛甾酮是主要的盐皮质激素，在它的合成过程中，第一步是黄体酮在C-21处羟化。由此形成的脱氧皮质酮在C-11处羟化。C-18角上甲基随后氧化成醛，产生醛甾酮。

## 雄激素和雌激素的合成

雄激素的合成（图20-21）从黄体酮在C-17的羟化开始。然后由C-20和C-21组成的侧链断裂产生一个雄激素——雄烯二酮。另一个雄激素——睾酮是由雄烯二酮的17-酮基被还原而形成的。雄激素含有十九个碳原子。雌激素是由雄激素失去C-19角上甲基并形成芳香A环而合成。这些反应需要NADPH和 $O_2$ 。雌酮是一个雌激素，它是由雄烯二酮演变而成的，而另一个雌激素——雌二醇是由睾酮形成的。

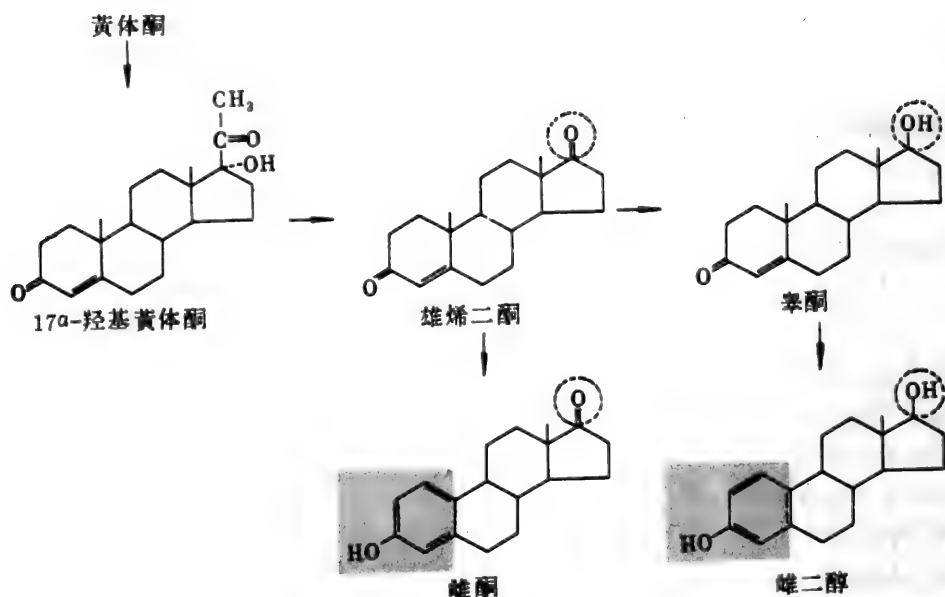


图 20-21 雄激素和雌激素的合成。

## 21-羟化酶缺乏症引起男性化和肾上腺增大

最常见的遗传性甾类激素合成失调症是由于缺乏**21-羟化酶**，它是糖皮质激素合成和盐皮质激素合成所需要的一种酶。糖皮质激素产量降低，使前脑下垂体分泌ACTH的数量增加。这种反应是正常的反馈机制的表达，它控制肾上腺皮质的活动。肾上腺增大是因为血液中**ACTH**的水平高，而且有更多的孕烯醇酮合成。结果黄体酮和17α-羟基黄体酮的浓度增加。然后雄激素的数量也有显著的增加，因为它们是从17α-羟基黄体酮演变来的。

引人注目的21-羟化酶缺乏症的临床现象是由于雄激素水平高而引起的**男性化**。在女性患者中，男性化现象通常在出生时即已明显可见。在女性胚胎发育的过程中，分泌的雄激素使外生殖器发生男性化现象。男性患儿的性器官在出生时外表正常，但几个月后性早熟就已十分明显。同时还有生长加快和很早期的骨成熟作用，因而身体矮小是典型的最终后果。21-羟化酶缺乏症患者中，约有半数的人持续地在尿中失去 $\text{Na}^+$ 。在他们体内，醛甾酮这个主要盐皮质激素的水平很低。盐分的损失造成脱水和低血压，这甚至可能引起休克和猝死。

对于21-羟化酶缺乏症已经可以实行有效的治疗。服用糖皮质激素可以提供这个必要的激素，并且同时消除ACTH分泌过量，从而使雄激素过量形成的现象也停止。也可以让失盐的患者服用盐皮质激素。如果患儿在两岁之内即开始治疗，21-羟化酶缺乏症的有些症状可以消退。

已知遗传性的甾类激素合成缺陷症还有其它几种。所涉及的酶包括11-羟化酶，17-羟化酶，3β-脱氢酶，和碳链裂解酶。所有这些酶的损伤都导致肾上腺代偿性肿大。因此，临床上把这一组失调症称为**先天性的肾上腺增生**。和21-羟化酶缺乏症一样，11-羟化酶缺乏病也伴有男性化现象。

## 维生素D通过光的作用从胆固醇演变而来

胆固醇也是维生素D的前体，维生素D在钙代谢和磷代谢的控制方面起重要作用。紫外光使7-脱氢胆固醇（维生素D<sub>3</sub>原）发生光解作用，成为前维生素D<sub>3</sub>，前维生素D<sub>3</sub>自动地异构化，成为维生素D<sub>3</sub>（图20-22）。维生素D<sub>3</sub>（胆钙化甾醇）通过在肝脏和肾脏中发生的羟化反应转化为活跃的激素。人在童年时期缺乏维生素D引起佝偻病，它的特征是软骨和骨的钙化不完全。1645年韦伯斯特，D.（Daniel Webster）对佝偻病做了如下的记载：

……整个骨结构柔软如软腊，松弛无力的两腿几乎不能支持体重所施加的压力；因此身躯过重使胫骨不得不向内弯曲；由于同一原因，两腿在顶部互相靠近；脊椎弯曲使背在腰部区域突出成驼峰，……患者衰弱无力，（在疾病的严重阶段）甚至坐不起来，更不必说站立……

佝偻病如此普遍，以致韦伯斯特称之为“英国人的小儿病。”我们现在知道，佝偻病在当时的儿童中如此流行，是由于在一年之内，有许多个月都很少阳光。因此，皮肤内的7-脱氢胆固醇不能光解成为前维生素D<sub>3</sub>。此外，他们的饮食中很少提供维生素D，因为这种维生素在大多数天然食品中的含量都很低。鱼肝油是一个著名的例外情况，因此多年来鱼肝油一直被用做维生素D的丰富来源。目前维生素D的最可靠的饮食来源是强化食品。在美国，强化牛奶的水平达每夸脱含400国际单位

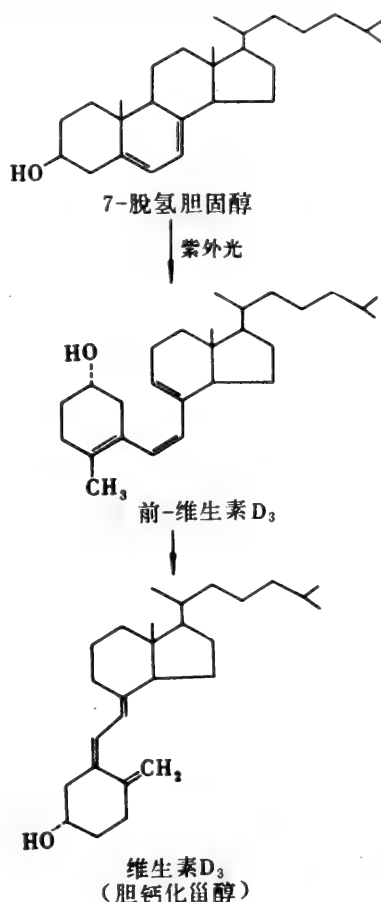


图20-22 7-脱氢胆固醇转变为维生素D（胆钙化甾醇）。维生素D<sub>2</sub>（麦角钙化甾醇）也可以通过类似的方式形成，起始原料是麦角甾醇，它是一种植物甾醇。维生素D<sub>2</sub>与D<sub>3</sub>的差别在于D<sub>2</sub>有C-22—C-23双键和一个C-24甲基。

（即每夸脱牛奶中含10μg维生素D）。人不论年龄长幼，建议每天摄取维生素D的量为400国际单位。在成年人中，维生素D缺乏导致骨骼软化无力，这种情况称为软骨病。阿拉伯贝都因妇女的服装使她们只露出眼睛可以见到日光，这些妇女常患软骨病是一个突出的事实，这提醒人们注意，成年人和儿童一样，都需要维生素D。

佝偻病（Rickets）——根据古英语Wrickken，扭曲。

软骨病（Osteomalacia）——根据希腊字Osteon，骨；malakia，软。

1夸脱=1.136523升——编辑注。

## 五-碳单元可以相互连接，形成多种生物分子

从异戊烯焦磷酸 ( $C_5$ ) 合成鲨烯 ( $C_{30}$ ) 是一个范例，代表生物分子中碳骨架组装的基本机制。异戊烯焦磷酸是一个基本的五碳构造单元，从它开始，可以形成一系列不寻常的化合物 (图20-23)。许多植物的香气是由挥发性的  $C_{10}$  和  $C_{15}$  化合物产生的，这些化合物称为萜类。举例来说，杨梅属植物叶的香叶烯 ( $C_{10}H_{16}$ ) 是由两个异戊二烯单位构成的，柠檬油中的苜烯 ( $C_{10}H_{15}$ ) 也是这样。姜油中的姜烯 ( $C_{15}H_{24}$ ) 是由三个异戊二烯单位构成的。有些萜类化合物如老鹳草属植物的牻牛儿醇和薄荷油的薄荷醇都是醇类化合物，另一些如香茅醛则是醛类化合物。天然橡胶是顺-异戊二烯单位的线性多聚物。

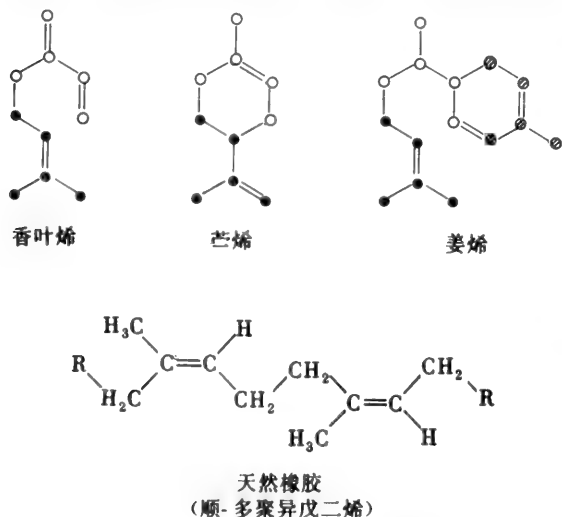


图20-23 几种类异戊二烯的结构式。

烃类侧链是由六个  $C_5$  单位构成的。在线粒体呼吸链中的辅酶  $Q_{10}$  (239 页) 有一条由十个异戊二烯单位组成的侧链。另外还有一个例子是叶绿素的叶绿醇侧链 (331 页)，它由四个异戊二烯单位形成。

类异戊二烯不仅通过它们的芳香，而且还通过它们的色彩，为人们带来喜悦。实际上，类异戊二烯简直可以被视为给人以美的感受的分子！番茄和胡萝卜的颜色来自类胡萝卜素，更确切地说，它们分别起因于番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素。这些化合物吸收光，因为它们含有延伸的单键和双键的网络——也就是说，它们是多烯。它们的  $C_{40}$  碳骨架是由  $C_5$  单位连续加成而成的，首先成为牻牛儿基牻牛儿焦磷酸，这是一个  $C_{20}$  中间产物，然后它再以一端与另一分子牻牛儿基牻牛儿焦磷酸的同一端相缩合。这条生物合成途径与鲨烯合成的途径相似，其差别仅在于本途径中是  $C_{20}$  单位相互组装和缩合，而不是  $C_{15}$  单位。



$C_{40}$  缩合产物是八氢番茄红素，它经脱水作用产生番茄红素。番茄红素的两端同时环化，就产生  $\beta$ -胡萝卜素 (图20-24)。在光合作用的酶集合体中，类胡萝卜素充当收集光的分子，而且在保护原核生物不受光照的有害影响方面，也起作用。类胡萝卜素对视觉也是必要的。 $\beta$ -胡萝卜素是视黄醛的前体，视黄醛是一切已知视觉色素的生色基团 (700 页)。这些例子都可以说明，在组装生物分子中延伸的碳骨架方面，异戊烯焦磷酸所起的基本作用。类异

“芳香、色彩、和声音相互呼应。” 鲍德莱尔，C. (Charles Baudelaire) 书信集。

戊二烯也显然是在自然界普遍存在的，并且具有形形色色的重要作用。

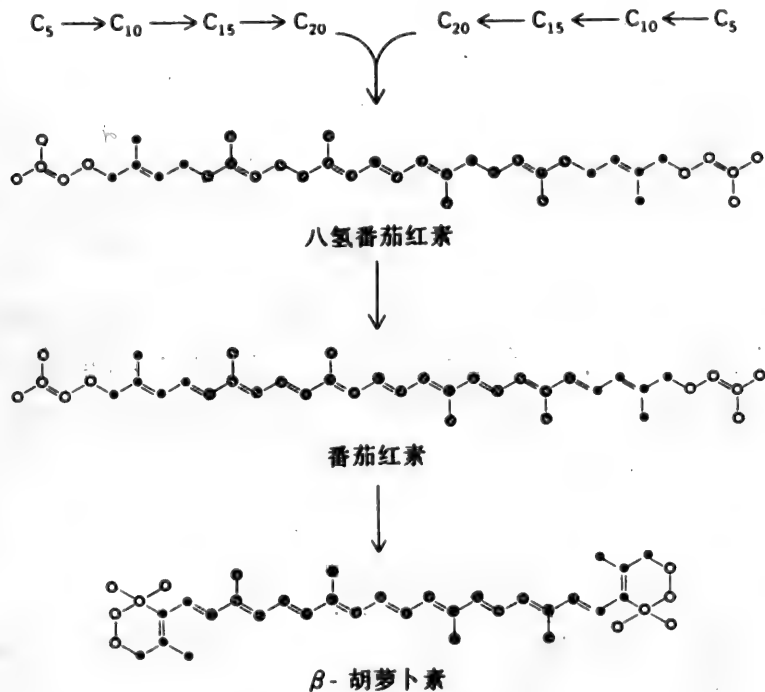


图20-24 C<sub>40</sub>类胡萝卜素：八氢番茄红素，番茄红素和β-胡萝卜素的合成。

### 概 要

磷脂酸是磷酸甘油酯合成和三酰基甘油合成的中间产物，它是通过酰基CoA使甘油3-磷酸酰化而形成的。它的磷酸基被水解之后，再继之以酰化作用，就产生三酰基甘油。CDP-二酰基甘油是磷酸甘油酯从头合成的活化中间产物，它由磷脂酸和CTP形成。然后，活化的磷脂酰单位被转移到一个极性醇（如丝氨酸）的羟基上，形成磷脂酰丝氨酸。这个磷酸甘油酯经脱羧作用，产生磷脂酰乙醇胺，它再由S-腺苷甲硫氨酸甲基化，形成磷脂酰胆碱。这个磷酸甘油酯也可以通过一个补救途径来合成。这条途径利用事先形成的胆碱。CDP-胆碱是这条路线中的活化中间产物。鞘脂类是从神经酰胺合成的，而神经酰胺是由鞘氨醇经过酰化产生的。神经节苷脂是含有一个寡糖单位的鞘脂，寡糖单位中至少有一个N-乙酰神经氨酸或一个相关的唾液酸。神经节苷脂是通过活化的糖（如UDP-葡萄糖）逐步加成到神经酰胺上而合成的。

胆固醇是真核生物膜的甾类组分，也是甾类激素的前体，它由乙酰CoA形成。在胆固醇形成的过程中，从3-羟基3-甲基戊二酰CoA（从乙酰CoA和乙酰乙酰CoA演化而来）合成甲羟戊酸是关键步骤。甲羟戊酸转变为异戊烯焦磷酸（C<sub>5</sub>），异戊烯焦磷酸再与一分子它的自身异构物二甲基丙烯焦磷酸（C<sub>5</sub>）缩合，形成牻牛儿基焦磷酸（C<sub>10</sub>）。第二个异戊烯焦磷酸分子的加成产生法呢基焦磷酸（C<sub>15</sub>），后者自身缩合，就形成鲨烯（C<sub>30</sub>）。这个

中间产物环化成羊毛甾醇 ( $C_{30}$ )，它再经修饰，就产生胆固醇 ( $C_{27}$ )。胆固醇在肝脏中的合成，随3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶的数量和活力的改变而受到调节，这个酶催化胆固醇生物合成中的关键步骤。在控制胆固醇进入除肝和肠以外的其它多数细胞方面，低密度脂蛋白受体起重要作用。

有五种主要的甾类激素是由胆固醇演变而成的：孕激素，糖皮质激素，盐皮质激素，雄激素和雌激素。在从胆固醇合成甾类激素和胆汁盐的过程中，混合功能加氧酶利用NADPH和 $O_2$ 的羟化反应起很重要的作用。孕烯醇酮 ( $C_{21}$ ) 是甾类激素合成中的一个关键中间产物，它是通过切去胆固醇的侧链而形成的。黄体酮 ( $C_{21}$ ) 是由孕烯醇酮合成的，它是皮质醇和醛甾酮的前体。黄体酮的侧链断裂产生雄烯二酮，这是一个雄激素 ( $C_{19}$ )。雌激素 ( $C_{18}$ ) 是由雄激素失去一个角上甲基并形成芳香A环而合成的。

维生素D在调节钙代谢和磷代谢方面很重要，它通过光的作用从胆固醇的衍生物形成。除胆固醇及其衍生物以外，还有一系列不寻常的生物分子是由异戊烯焦磷酸这个基本的五碳构造单元合成的。维生素K<sub>2</sub>，辅酶Q<sub>10</sub>和叶绿素的烃侧链都是由这个活化 $C_5$ 单位构成长链的实例。

## 习 题

1. 请写出平衡的方程式，表明三酰基甘油的合成，起始原料为甘油和脂肪酸。
2. 请写出平衡的方程式，表明磷脂酰丝氨酸从头合成的途径，起始原料为丝氨酸、甘油和脂肪酸。
3. 请写出下列生物合成过程中各自的活化反应物：
  - (a) 从丝氨酸合成磷脂酰丝氨酸。
  - (b) 从乙醇胺合成磷脂酰乙醇胺。
  - (c) 从鞘氨醇合成神经酰胺。
  - (d) 从神经酰胺合成鞘磷脂。
  - (e) 从神经酰胺合成脑苷脂。
  - (f) 从神经节苷脂 $G_{M2}$ 合成神经节苷脂 $G_{M1}$ 。
  - (g) 从牦牛儿基焦磷酸合成法呢基焦磷酸。
4. 请说明从下列前体合成胆固醇时，同位素标记在胆固醇中的分布情况：
  - (a) 甲羟戊酸，它的羧基碳原子用 $^{14}C$ 标记。
  - (b) 丙二酸单酰CoA，它的羧基碳原子用 $^{14}C$ 标记。



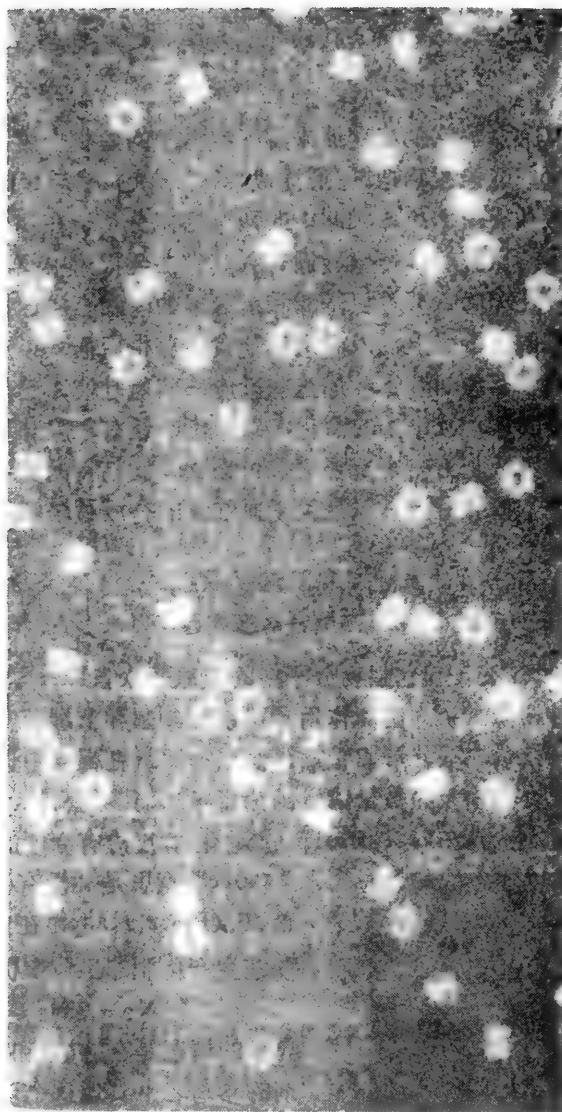


图21-1 大肠杆菌谷酰胺合成酶的电镜照片。这个酶在氮代谢中起关键性作用。[蒙Dr. Earl Stadtmann 特许。]

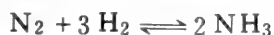
## 第21章 氨基酸和血红素的生物合成

本章论述氨基酸及从它们演变而来的一些分子的生物合成。首先考虑氮是如何流入氨基酸的。这个过程从固氮微生物把 $N_2$ 还原成 $NH_4^+$ 开始。然后 $NH_4^+$ 通过谷氨酸和谷酰胺同化入氨基酸，谷氨酸和谷酰胺是氮代谢中的两个枢纽分子。在基本的一套二十种氨基酸中，有十种是通过很简单的反应，从柠檬酸循环和其它主要代谢中间产物合成的。我们将考虑这些生物合成作用，并专门考查芳香氨基酸和组氨酸的生物合成，把它们作为通过较为复杂的路线形成氨基酸的范例。事实上，人必须从饮食中获得后面一组十种氨基酸，所以它们被称为必需的氨基酸。两个有趣的载体参加这些反应：四氢叶酸，它是一个有高度灵活性的载体，可以携带在三个不同氧化水平上的活化一碳单位；还有S-腺苷甲硫氨酸，它是主要的甲基供体。氨基酸代谢的调节是另一个重要的探讨领域。我们将浏览一下谷酰胺合成酶，它是某些普遍原则的范例。本章的最后一节是关于血红素的合成与降解。

### 微生物利用ATP和一种强还原剂把 $N_2$ 转变为 $NH_4^+$

氨基酸、嘌呤、嘧啶及其它生物分子中的氮原子来自 $NH_4^+$ 。高等生物不能把 $N_2$ 转变为有机的形式，而这种转变（称为固氮作用）可以由细菌和蓝绿藻实现。有些微生物（如根瘤菌属细菌）侵入豆科植物的根，形成根瘤，固氮作用就在根瘤中进行（图21-2）。细菌与植物之间是共生关系。微生物固氮的数量估计约为每年 $2 \times 10^{11}$ 公斤。

$N \equiv N$ 键的键能为225kcal/mol，它对化学反应有高度的稳定性。拉瓦锡甚至称之为“azote”，意思是“没有生命”，因为它十分不活泼。哈伯，F. (Fritz Haber) 在1910年发明的工业固氮法，目前在生产化肥的工厂中仍然使用，



典型的情况是在500℃和300个大气压之下，在铁催化剂的参与之下实现这个反应。因此，生物固氮过程需要一种复杂的酶，这是不足为怪的。实现这个过程的固氮酶复合物由两种蛋白质组分构成：一个是还原酶，它提供还原力很强的电子；另一个是固氮酶，它利用这些电子把 $N_2$ 还原成 $NH_4^+$ （图21-3）。每个组分是一个铁-硫蛋白，其中铁与一个半胱氨酸残基的硫原子结合，也与无机的硫化物结合（238页）。复合物中的固氮酶组分也含一个或两个钼原子，因此被称为钼铁蛋

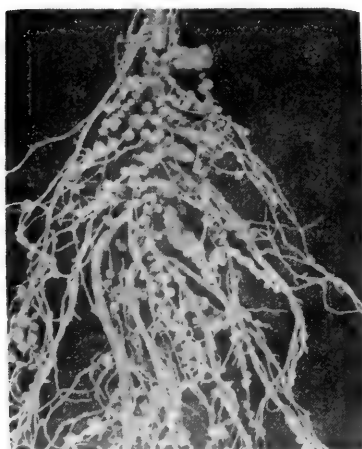


图21 2 大豆根系的根瘤是根瘤菌属细菌固氮的场所 [承Nitragin公司Dr. Joe C. Burton博士特许。]

白，它的亚基结构是 $\alpha_2\beta_2$ ，质量约为200kda1。还原酶(也称为铁蛋白)由两条完全相同的多肽链组成，质量约为65kda1。在固氮酶复合物中，有一个或两个铁蛋白与一个钼铁蛋白相缔合。

固氮酶复合物把 $N_2$ 转变为 $NH_4^+$ ，需要ATP和一个强还原剂。在多数固氮微生物中，这个六电子还原作用中的高电位电子的来源是还原态铁氧还蛋白，它是我们以前在讨论光合作用时提到过的电子载体(335页)。至于还原态铁氧还蛋白在此之后是通过光合作用再生，或是通过氧化过程而再生，这要决定于每个特定的物种。由固氮酶复合物所催化的反应的化学计算关系为：

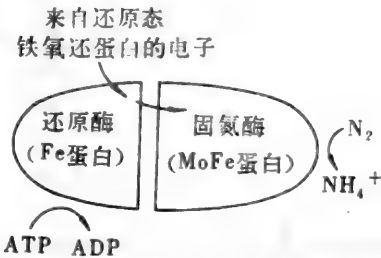
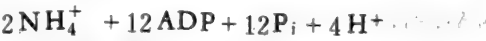


图21-3 固氮酶复合物的示意图。在 $N_2$ 转变为 $NH_4^+$ 以前，还原酶与固氮酶组分分离。

关于固氮酶的最新研究提示下述的反应顺序。首先，还原态铁氧还蛋白把自己的电子传递给复合物的还原酶组分。其次，ATP再与还原酶相结合，并通过改变其构象而将它的氧还电势从-0.29V变为-0.40V。还原酶的还原能力由此加强，使它能把自己的电子传递给固氮酶组分。第三步，电子被转移，ATP被水解，而还原酶与固氮酶组分离开。最后，与复合物的固氮酶组分相结合的 $N_2$ 被还原为 $NH_4^+$ 。

用哈伯氏反应通过化学方法生产氨，所需的能源正日趋缺乏和价格昂贵，因此目前人们对加强微生物固氮作用有很大兴趣。一个有希望的方法是把固氮基因引入非豆科植物，如谷类作物中。必须克服的一个困难是固氮酶复合物遇 $O_2$ 失活，而且是异常的敏感。豆科植物通过使 $O_2$ 与豆血红蛋白相结合，而保持其根瘤中自由 $O_2$ 的浓度很低。在形成新的固氮植物的物种中，还必须遇到另一个挑战，那就是要求ATP要以极快的速度形成。实际上，在豌豆植株的根中，固氮细菌消耗植株所产生的ATP数量的近五分之一。一个补充性的方法是加快蓝绿藻固氮作用的速度。蓝绿藻通过光合作用产生它们自己的ATP，因而并不依赖于一种提供能量的共生关系。

### $NH_4^+$ 经由谷氨酸和谷酰胺被同化进入氨基酸

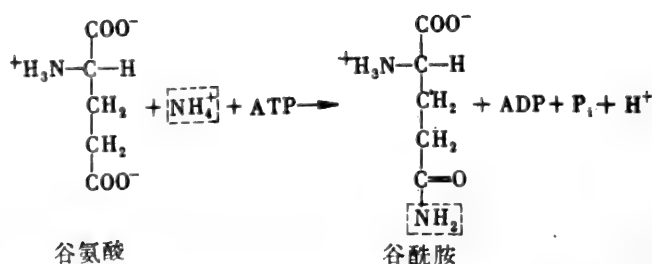
氮被同化进入生物分子的第二步是 $NH_4^+$ 进入氨基酸。谷氨酸和谷酰胺在这方面起枢纽作用。多数氨基酸的 $\alpha$ -氨基都是通过转氨作用得自谷氨酸的 $\alpha$ -氨基。谷酰胺是另一个主要的氮供件，它在多种重要化合物的生物合成中，都贡献出自己的侧链氮原子。

谷氨酸是通过谷氨酸脱氢酶的作用，从 $NH_4^+$ 和 $\alpha$ -酮戊二酸合成的， $\alpha$ -酮戊二酸是柠檬酸循环的中间产物。在讨论氨基酸的降解时(311页)，我们已经提到过谷氨酸脱氢酶。在生物合成的方向中，NADPH是还原剂，而在分解的方向中， $NAD^+$ 是氧化剂。



通过谷酰胺合成酶的作用，铵离子掺入谷酰胺。这个酰胺化作用是由ATP水解所驱动的。谷酰胺合成酶的调节在控制氮代谢方面起关键性的作用，后面不久即将讨论到这个问题。

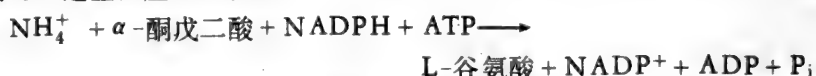
谷氨酸脱氢酶和谷酰胺合成酶存在于一切有机体内。多数原核生物还含有谷氨酸合酶，



它催化 $\alpha$ -酮戊二酸的还原性氨化反应。在这个反应里，氮的供体是谷酰胺，因此有两个分子的谷氨酸形成。



当 $\text{NH}_4^+$ 以最小限量存在时，大部分的谷氨酸是由谷酰胺合成酶和谷氨酸合酶按顺序依次起作用而形成的。这些反应的总和是



注意这个反应的化学计算关系与谷氨酸脱氢酶的反应情况不同，因为在本反应中有一分子ATP被水解。为什么这样一条代价较高的途径有时仍为大肠杆菌所采用？回答是因为谷氨酸脱氢酶对 $\text{NH}_4^+$ 的 $K_M$ 很高（ $\sim 1 \text{ mmol/L}$ ），所以当 $\text{NH}_4^+$ 以最少限量存在时，这个酶就不能达到饱和。与此相反，谷酰胺合成酶对 $\text{NH}_4^+$ 有很强的亲和力。

氨基酸是从柠檬酸循环和其它主要代谢中间产物合成的

到目前为止，我们已经考虑了 $\text{N}_2$ 转变为 $\text{NH}_4^+$ 的过程，以及 $\text{NH}_4^+$ 同化进入谷氨酸和谷酰胺的过程。现在我们将转入讨论其它氨基酸的生物合成。细菌如大肠杆菌可以合成全套的二十种基本氨基酸，而人只能制造其中的一半。必须在饮食中提供的氨基酸称为必需的氨基酸，而其余的则被称为非必需的氨基酸（表21-1）。这些名称仅说明在一套特定的条件下，一种有

表 21-1 20种基本的氨基酸

非 必 需 的	必 需 的
丙氨酸	精氨酸
天冬酰胺	组氨酸
天冬氨酸	异亮氨酸
半胱氨酸	亮氨酸
谷氨酸	赖氨酸
谷酰胺	甲硫氨酸
甘氨酸	苯丙氨酸
脯氨酸	苏氨酸
丝氨酸	色氨酸
酪氨酸	缬氨酸

机体的需要。例如脲循环合成精氨酸的数量，可以满足成年人的需要，但不能满足一个正在生长的孩子的需要。仅仅缺乏一种氨基酸也可以引起负氮平衡，在此情况下，蛋白质降解的数量多于合成的数量，因而排出的氮多于摄取的氮。

氨基酸生物合成的途径是多样的。但是，它们都有一个重要的共同特点：它们的碳骨架来自糖酵解途径、戊糖磷酸途径、或柠檬酸循环的中间产物。进一步的简化说法是总共只有六种生物合成的类别（图21-4）。

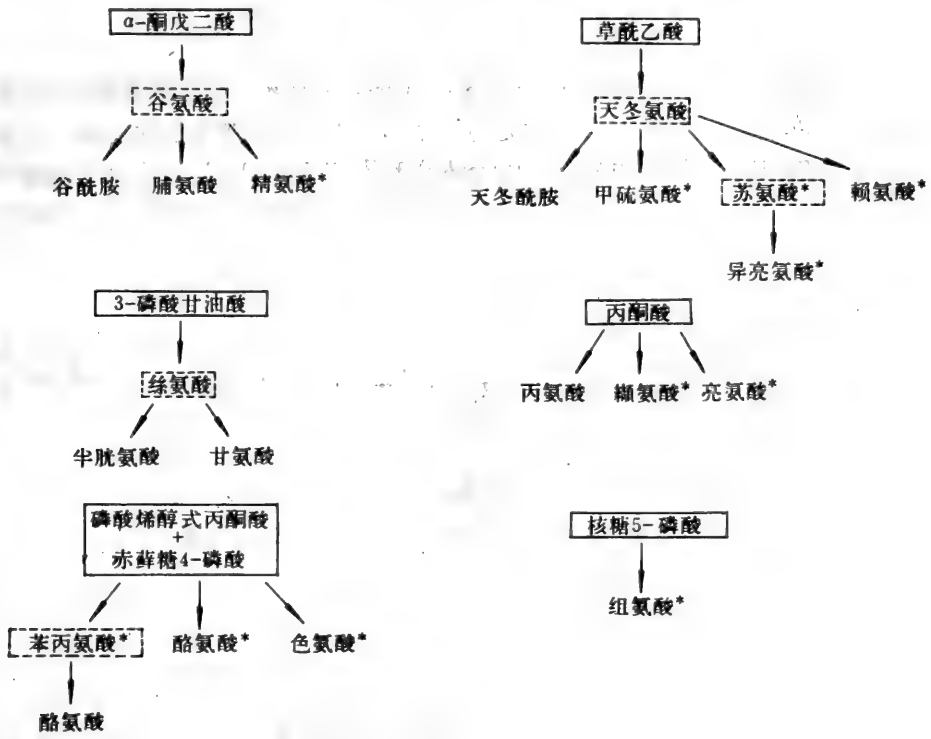
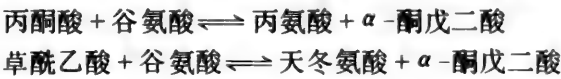
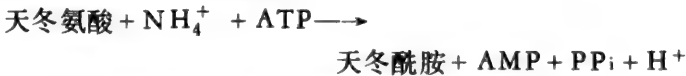


图21-4 氨基酸生物合成的类别。主要的代谢前体用实线框示。产生其它氨基酸的氨基酸用虚线框示。必需氨基酸用星号表示。

非必需的氨基酸通过很简单的反应就可以合成，而必需氨基酸形成的途径则相当复杂。例如，非必需氨基酸丙氨酸和天冬氨酸可以分别从丙酮酸和草酰乙酸通过一步反应而合成。每个氨基酸都从谷氨酸获得它的氨基，在这个转氨反应中，吡哆醛磷酸是辅助因子（312页）：



然后再通过天冬氨酸的酰胺化作用合成天冬酰胺：



在哺乳类动物中，天冬酰胺合成中的氮供体是谷酰胺，而不是 $\text{NH}_4^+$ 。

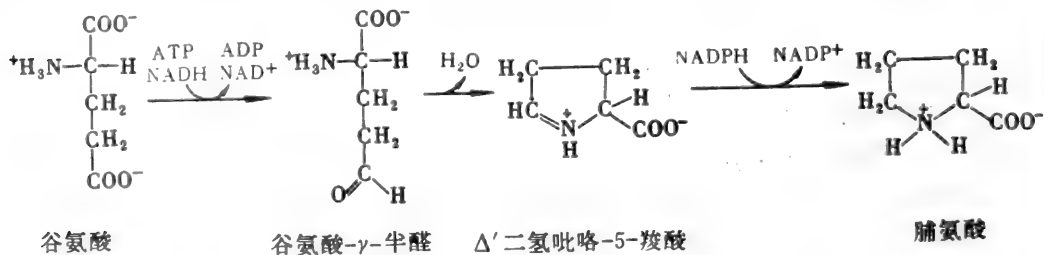
另一个一步合成的非必需氨基酸是由苯丙氨酸(必需氨基酸)羟化成为酪氨酸, 这个反应在哺乳类动物中存在。



这个反应受苯丙氨酸羟化酶的催化, 它是一个以前已经讨论过的单加氧酶(324页)。值得注意的是在缺乏这个酶的生物个体中, 酪氨酸成为必需的氨基酸。

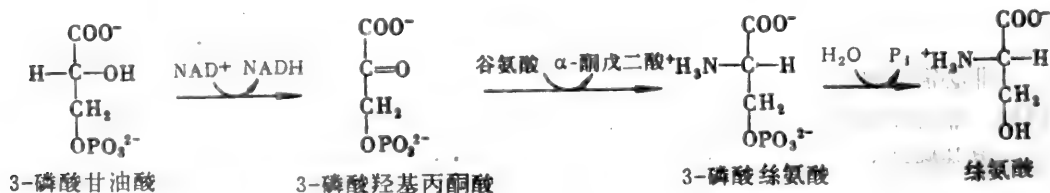
### 谷氨酸是谷酰胺和脯氨酸的前体

前面已经讨论过,  $\alpha$ -酮戊二酸经还原性氨化作用可以合成谷氨酸(373页), 而谷氨酸可以转化为谷酰胺(374页)。谷氨酸是另一个非必需氨基酸脯氨酸的前体。首先, 谷氨酸的 $\gamma$ -羧基与ATP反应, 产生酰基磷酸。这个混合酐再被NADPH还原成醛。谷氨酸 $\gamma$ -半醛环化, 并失去一分子 $\text{H}_2\text{O}$ , 形成 $\Delta'$ -二氢吡咯-5-羧酸, 它再经NADPH还原, 产生脯氨酸。



### 丝氨酸由3-磷酸甘油酸合成

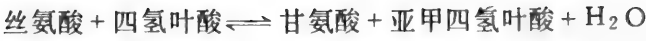
丝氨酸是由3-磷酸甘油酸合成的, 后者是糖酵解的中间产物。第一步是氧化成3-磷酸羟基丙酮酸, 这个 $\alpha$ -酮酸经转氨作用成为3-磷酸丝氨酸, 后者再经水解, 产生丝氨酸。



此外还有另外一条途径, 即磷酸基水解后可能接着发生氧化和转氨作用:



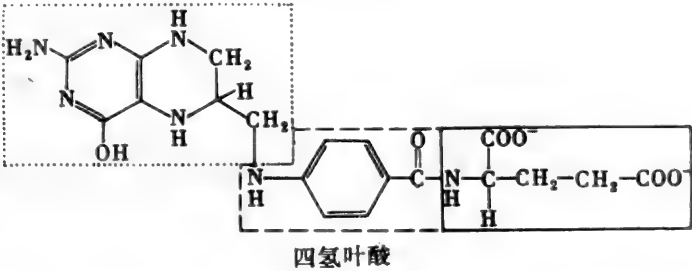
丝氨酸是甘氨酸和半胱氨酸的前体。在甘氨酸形成的过程中, 丝氨酸侧链的 $\beta$ -碳原子转移给四氢叶酸。四氢叶酸是一碳单位的载体, 下面即将谈到它。



这个转变受丝氨酸转羟甲基酶的催化，它是一个吡哆醛磷酸（PLP）酶。由于在丝氨酸和PLP之间形成了一个希夫氏碱，使丝氨酸的 $\alpha$ -碳原子与 $\beta$ -碳原子间的键变得不稳定。然后丝氨酸的 $\beta$ -碳原子转移给四氢叶酸。甘氨酸也可以从 $\text{CO}_2$ 、 $\text{NH}_4^+$ 和亚甲四氢叶酸形成，这个反应由甘氨酸合酶催化。丝氨酸转变为半胱氨酸要求来自甲硫氨酸的硫原子取代侧链氧原子。这个反应顺序当在考虑过一碳代谢之后再提出来讨论。

### 四氢叶酸携带处于不同氧化水平的活化一碳单位

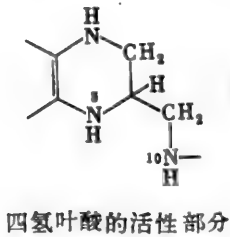
四氢叶酸（又称四叶蝶酰谷氨酸）是一碳单位的高度灵活的载体，它由三个组分构成：一个取代的蝶啶，对氨基苯甲酸和谷氨酸。哺乳类动物不能合成蝶啶环。它们从饮食中获得四氢叶酸，或者通过它们自己肠道中的微生物获得四氢叶酸。



四氢叶酸所携带的一碳基团与它的N-5或N-10氮原子（符号为 $\text{N}^5$ 和 $\text{N}^{10}$ ）结合，或者同时与这两个氮原子结合。这个单位可以三种氧化状态存在（表21-2）。最还原的形式带一个

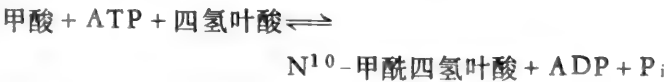
表21-2 四氢叶酸所携带的一碳基团

氧化状态		基 团
最 还 原	$-\text{CH}_3$	甲 基
中 间 态	$-\text{CH}_2-$	亚 甲 基
最 氧 化	$-\text{CHO}$	甲 酰 基
	$-\text{CHNH}$	亚胺甲基
	$-\text{CH}=\text{}$	次 甲 基



甲基，而中间水平的形式带一个亚甲基，最氧化的形式带一个次甲基、甲酰基或亚胺甲基。最氧化的一碳单位是 $\text{CO}_2$ ，它由生物素（266页）携带，而不是由四氢叶酸携带。

这些一碳单位是可以相互转变的（图21-5）。 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲四氢叶酸可以还原成为 $\text{N}^5$ -甲基四氢叶酸，或氧化成 $\text{N}^5$ -次甲四氢叶酸。 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -次甲四氢叶酸可以转变为 $\text{N}^5$ -亚胺甲基四氢叶酸和 $\text{N}^{10}$ -甲酰四氢叶酸，它们都处于同一氧化水平。 $\text{N}^{10}$ -甲酰四氢叶酸也可以从甲酸和ATP合成：



这些四氢叶酸衍生物在多种生物合成中充当一碳单位的供体。后面不久即将讨论到，**甲硫氨酸**是通过 $N^5$  甲基四氢叶酸的甲基转移，而从高半胱氨酸合成的。嘌呤中有些碳原子来自四氢叶酸的 $N^5, N^{10}$  次甲基衍生物和 $N^{10}$  甲酰衍生物。胸腺嘧啶的甲基来自 $N^5, N^{10}$ -亚

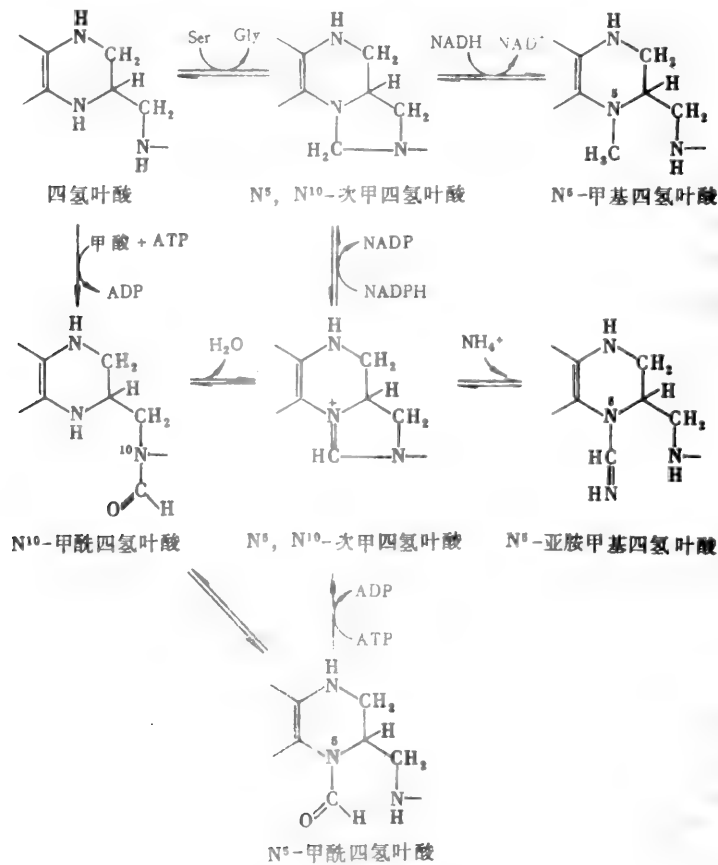


图21-5 四氢叶酸所携带的一碳单位相互转变。

**甲四氢叶酸**。这个四氢叶酸衍生物在从 $CO_2$ 和 $NH_4^+$ 合成甘氨酸的过程中，也给出一个一碳单位，这个反应受甘氨酸合酶的催化。



因此，在生物合成过程中，处于三个不同氧化水平的每一个水平上的一碳单位都被利用。然后**四氢叶酸**又依次在降解反应中充当一碳单位的受体。一碳单位的主要来源是**丝氨酸**转变为**甘氨酸**，如前所述，它产生 $N^5, N^{10}$ -亚甲四氢叶酸。丝氨酸可以从3-磷酸甘油酸演变而来（376页），因此这条途径使一碳单位可以从糖类从头形成。组氨酸分解产生**N-亚胺甲基谷氨酸**，它把自己的亚胺甲基转移给四氢叶酸，形成 $N^5$ 衍生物。



## S-腺苷甲硫氨酸是甲基的主要供体

四氢叶酸可以在它的N<sup>5</sup>-原子上携带一个甲基，但是它的转移电位不够高。更确切地说，在多数生物合成中，活化的甲基供体是**S-腺苷甲硫氨酸**（图21-6）。在讨论磷脂酰乙醇胺转变为磷脂酰胆碱时，我们曾说到S-腺苷甲硫氨酸（351页），它是通过从ATP转移一个腺苷基团给甲硫氨酸的硫原子而合成的。甲硫氨酸单位的甲基由相邻硫原子的正电荷所活化，这使它比N<sup>5</sup>-甲基四氢叶酸活泼得多。

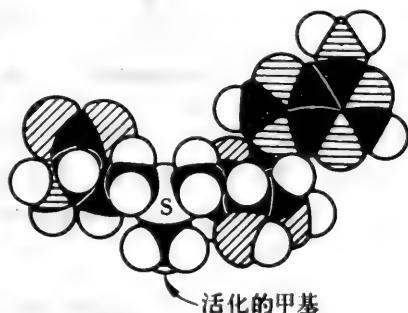
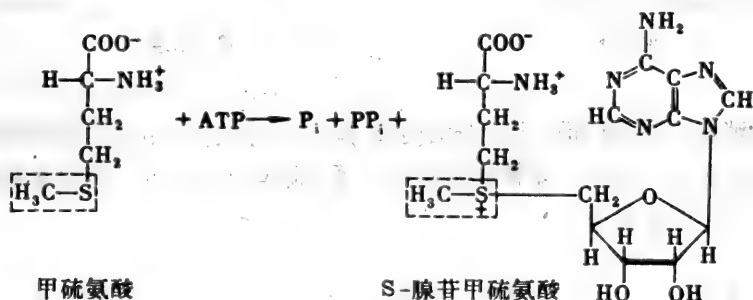
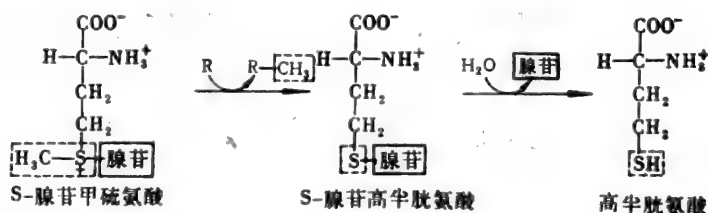


图21-6 S-腺苷甲硫氨酸的空间填充模型。

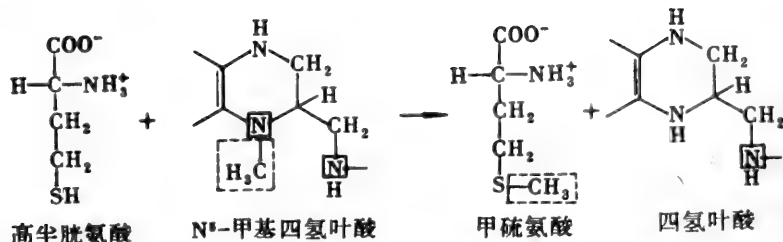


S-腺苷甲硫氨酸合成的不寻常之处，在于ATP的三磷酸基断裂成焦磷酸和正磷酸。然后焦磷酸再水解。因此，在这个活化反应中，ATP的全部磷—氧键都已断裂，这大大地加强了甲基的活泼性。

当S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移给受体（如磷脂酰乙醇胺）时，有S-腺苷高半胱氨酸形成。然后S-腺苷高半胱氨酸再水解成高半胱氨酸和腺苷。



甲硫氨酸可以通过从N<sup>5</sup>-甲基四氢叶酸转移一个甲基而再生，这个反应受高半胱氨酸甲基转移酶的催化。这个甲基转移是通过甲基钴胺素实现的，甲基钴胺素是高半胱氨酸转甲基酶的辅酶。事实上，这个反应及L-甲基丙二酰CoA重新排列成琥珀酰CoA的反应（320页），



是在哺乳类动物中仅有的两个已知依赖于维生素B<sub>12</sub>的反应。此外，高半胱氨酸也可由供体如甜菜碱甲基化成甲硫氨酸，甜菜碱是胆碱的氧化产物。

这些反应构成活化的甲基循环（图21-7）。在高半胱氨酸转变为甲硫氨酸时，甲基进入循

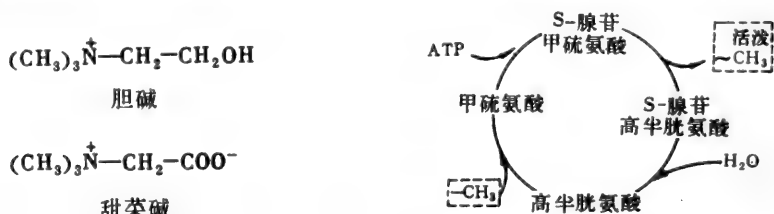


图21-7 活化的甲基循环。

环，然后通过消耗三个~P而变得十分活泼。S-腺苷甲硫氨酸中甲基的高转移电位使它可以转移给一系列形形色色的受体，如神经递素去甲肾上腺素（698页）的氨基和趋化性中一个调节蛋白（708页）的谷氨酸残基。

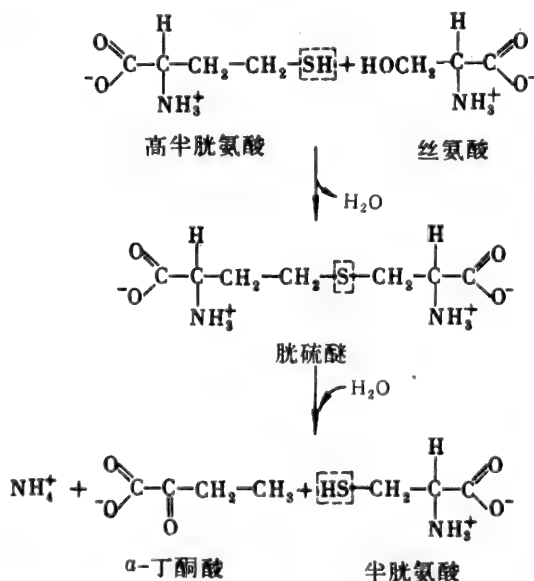
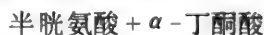


图21-8 半胱氨酸的合成。

我们关于非必需氨基酸的生物合成的讨论到此结束。苯丙氨酸经羟化作用而形成酪氨酸的过程，前面已经讨论过了（324页）。

## 半胱氨酸是从丝氨酸和高半胱氨酸合成的

高半胱氨酸除在活化甲基循环中是甲硫氨酸的前体外，也是半胱氨酸合成中的一个中间产物。丝氨酸和高半胱氨酸缩合，形成胱硫醚（图21-8）。这个反应由胱硫醚合成酶催化，该酶是一个PLP酶。然后胱硫醚再脱氨，并被胱硫醚酶裂解，成半胱氨酸和α-丁酮酸，胱硫醚酶也是一个PLP酶。净反应是：



请注意半胱氨酸的硫原子是从高半胱氨酸演变来的，而碳骨架则来自丝氨酸。

## 莽草酸和分支酸是芳香氨基酸生物合成的中间产物

我们现在转向讨论必需氨基酸的生物合成，它们的合成途径比非必需氨基酸的途径复杂得多。在这里选择两条途径来讨论——即芳香氨基酸的合成和组氨酸的合成。

大肠杆菌通过一个共同的途径合成苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸（图21-9）。第一步是磷酸烯醇式丙酮酸（糖酵解中间产物）和赤藓糖4-磷酸（戊糖磷酸途径的中间产物）缩合。由此形成的C<sub>7</sub>开链糖失去其磷酸基，并环化成5-脱氢奎尼酸，然后经脱水作用产生5-脱氢莽草酸，它再经NADPH还原为莽草酸（图20-10）。然后另一分子的磷酸烯醇式丙酮酸再与5-磷酸莽草酸缩合，产生一个中间产物，再失去它的磷酸基，形成分支酸。

以分支酸为起点，后面分为两条途径。让我们首先讨论预苯酸支路（图21-11）。变位酶把分支酸转变为预苯酸，预苯酸是苯丙氨酸和酪氨酸的芳香环的直接前体。脱水和脱羧作用产生苯丙酮酸。另一种可能，预苯酸也可以经氧化脱羧形成对-羟基苯丙酮酸。这些 $\alpha$ -酮酸然后再经转氨作用，分别产生苯丙氨酸和酪氨酸。

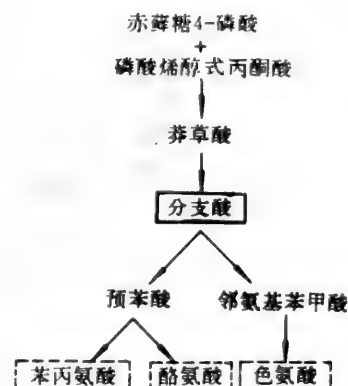


图21-9 大肠杆菌中芳香氨基酸的生物合成途径。

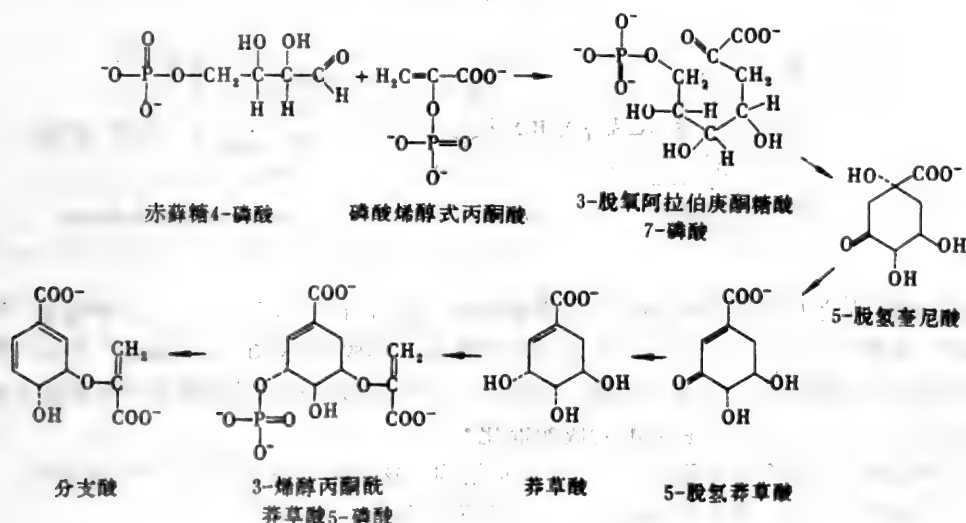


图21-10 分支酸的合成。分支酸是大肠杆菌的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成的中间产物。

以邻氨基苯甲酸为起点的另一支路导致色氨酸的合成。分支酸从谷酰胺侧链获得一个氨基，形成邻氨基苯甲酸。事实上，谷酰胺在许多生物合成反应中都充当氨基供体。然后邻氨基苯甲酸再与磷酸核糖焦磷酸（PRPP）缩合，后者是核糖磷酸的活化形式。PRPP在组氨酸、

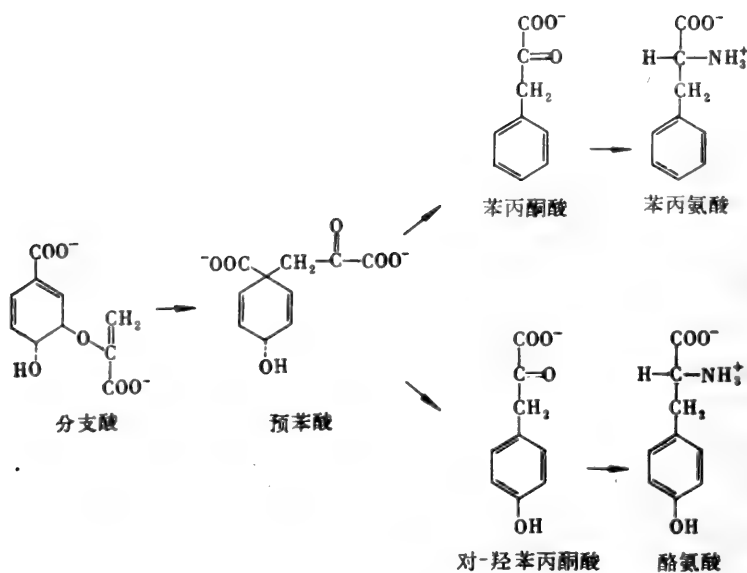
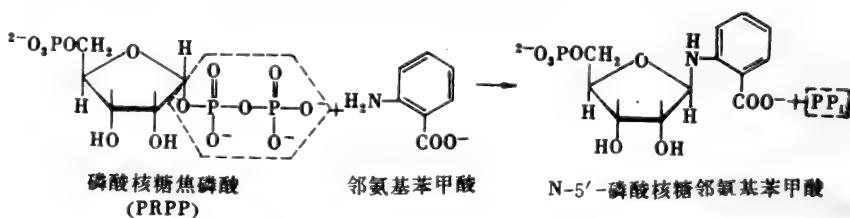


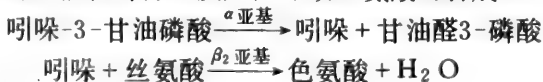
图21-11 从分支酸合成苯丙氨酸和酪氨酸。

嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的合成中，也都是关键性的中间产物（396页）。核糖5-磷酸的C-1原子与邻氨基苯甲酸的氮原子结合，这个反应由焦磷酸水解所驱动。



磷酸核糖邻氨基苯甲酸的核糖部分经历重新排列（图21-12），产生1-(邻-羧苯氨基)-1-脱氧核酮糖5-磷酸。这个中间产物再经脱水和脱羧作用，形成吲哚-3-甘油磷酸。最后，吲哚-3-甘油磷酸与丝氨酸反应，生成色氨酸。吲哚-3-甘油磷酸的甘油磷酸侧链被丝氨酸的碳骨架和氨基所取代。这个反应受色氨酸合成酶催化。

大肠杆菌的色氨酸合成酶具有 $\alpha_2\beta_2$ 亚基结构。这个酶可以离解为两个 $\alpha$ 亚基和一个 $\beta_2$ 亚基。分离的亚基可以催化部分的反应，导致色氨酸的合成：



$\beta_2$ 亚基上的每个活性部位含有一个PLP辅基。 $\alpha_2\beta_2$ 复合物的形成使 $\alpha$ 亚基和 $\beta_2$ 亚基的催化性质发生显著的变化。 $\alpha_2\beta_2$ 复合物催化部分反应的速度比分离的亚基要加快十倍以上。此外， $\alpha_2\beta_2$ 复合物通个一种协同的机制合成色氨酸。第一部分反应形成的吲哚立即与丝氨酸反应，因而吲哚并不从 $\alpha_2\beta_2$ 复合物释放出来。由此可见，多亚基酶可以通过它的亚基间的

相互作用而改变其催化性质（图21-13）。

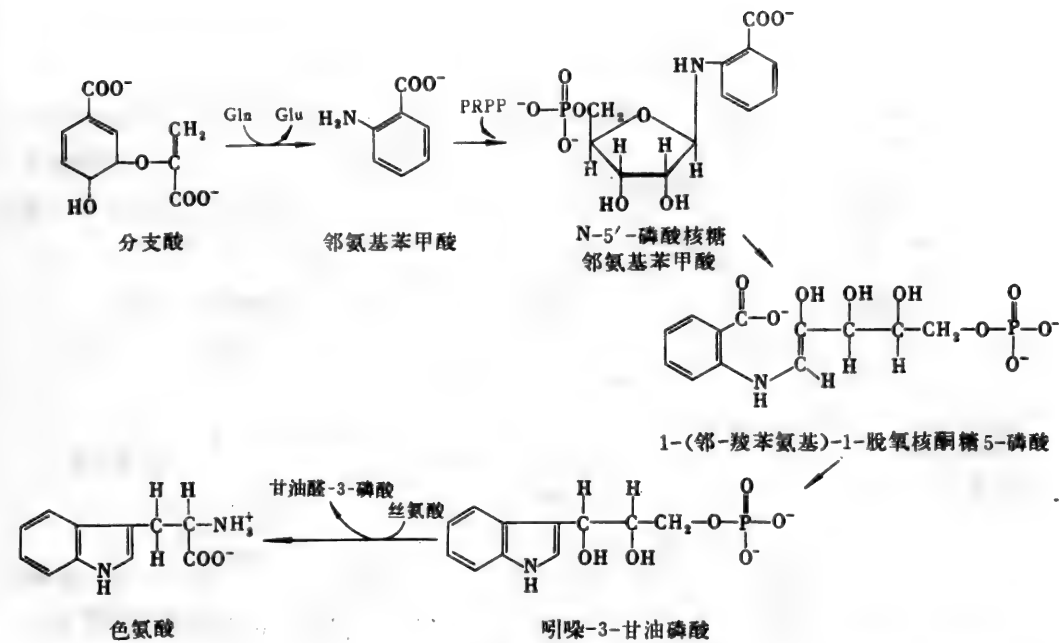


图21-12 从分支酸合成色氨酸。

## 组氨酸是从ATP，PRPP 和谷酰胺合成的

大肠杆菌和沙门氏菌的组氨酸生物合成途径具有许多复杂和新颖的特点（图21-14）。反应顺序从ATP与PRPP缩合开始，这时嘌呤环上的N-1与PRPP的核糖单位的C-1结合。事实上，组氨酸的五个碳原子来自PRPP。ATP的腺嘌呤单位提供组氨酸咪唑环上的一个氮原子和一个碳原子。咪唑环上的另一个氮原子来自谷酰胺的侧链。这个途径有一个值得注意的方面，即5-氨基咪唑-4-氨基甲酰核苷酸是嘌呤生物合成的中间产物（398页），而5-氨基咪唑-4-氨基甲酰核苷酸是在形成咪唑环的裂解反应中产生的。因此，组氨酸生物合成与嘌呤生物合成是相互联系的。

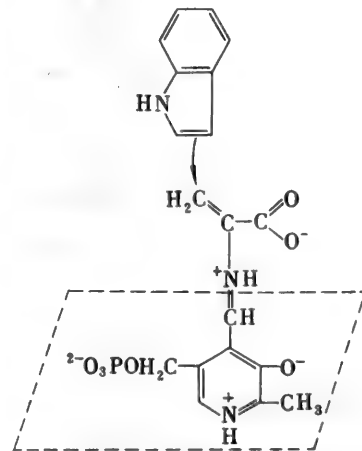


图21-13 在色氨酸合成过程中，可能出现的中间产物。丝氨酸与β链上的PLP形成希夫碱，然后再脱水，形成氨基丙酮酸的希夫碱（加框示出）。这个与酶结合的中间产物和吲哚反应，产生色氨酸；吲哚是α亚基催化的那部分反应的产物。

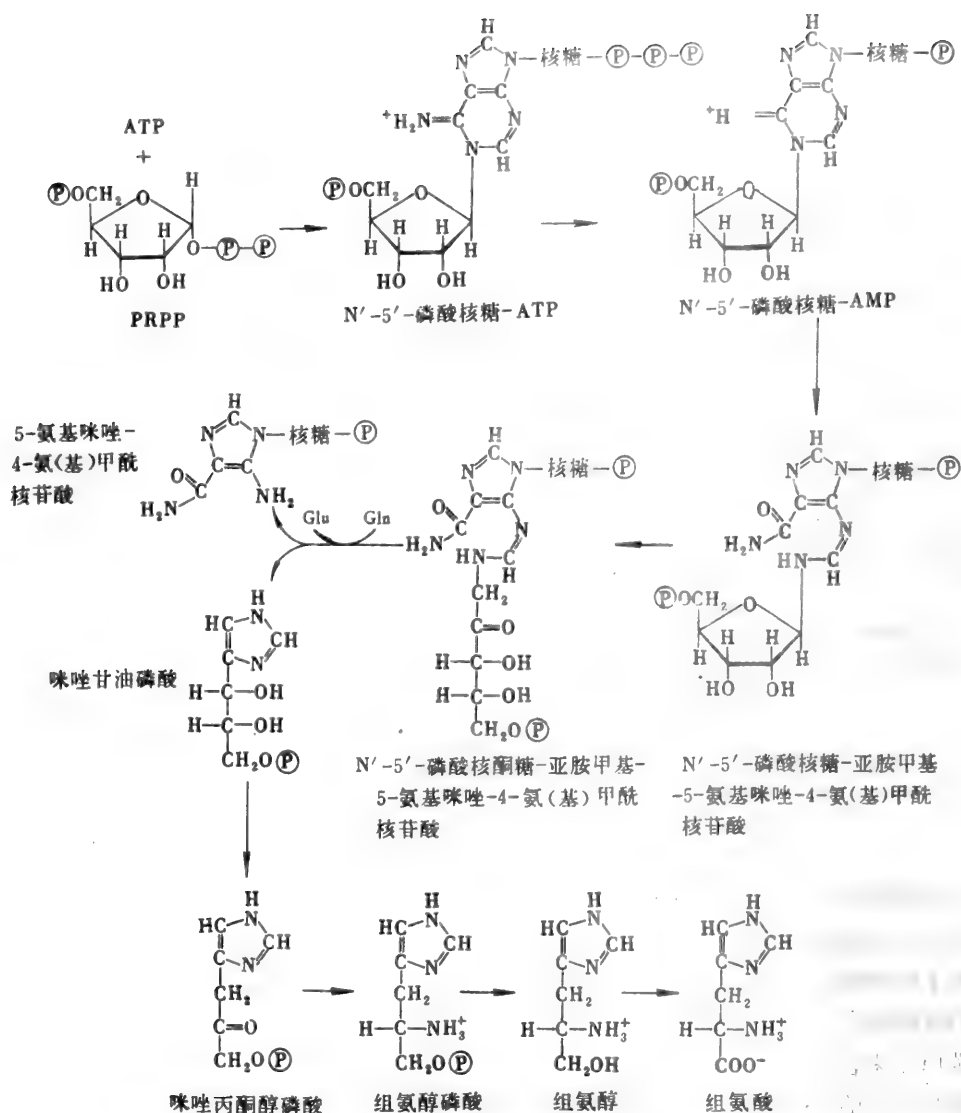
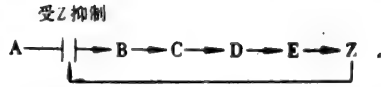


图21-14 大肠杆菌和沙门氏菌的组氨酸生物合成途径 (Ⓟ代表一个磷酸基)。

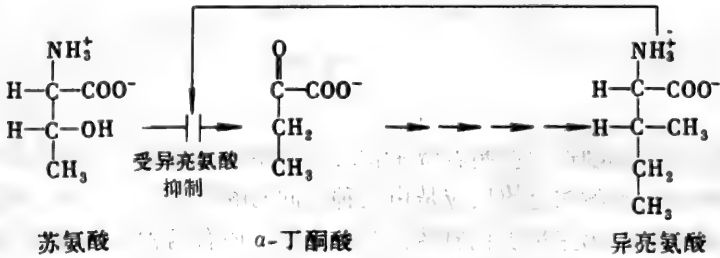
## 氨基酸的生物合成受反馈抑制的调节

氨基酸合成的速度主要决定于生物合成的酶的数量及其催化活力。现在让我们来考虑酶催化活力的控制。酶合成的调节问题将在第28章中讨论。

生物合成途径中第一个不可逆反应称为关键步骤 (committed step)，它通常是一个重要的调节部位。合成途径的最终产物 (Z) 常常抑制催化关键步骤 (A → B) 的酶。对于保护合成作用的构造单元和代谢能量来说，这种控制是必要的。

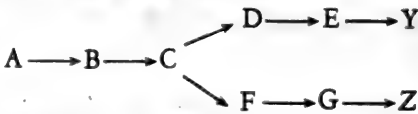


这种代谢控制的重要原则的第一个实例来自关于大肠杆菌异亮氨酸生物合成进行的研究。在异亮氨酸的合成过程中，苏氨酸经脱水和脱氨作用形成 $\alpha$ -丁酮酸是关键步骤。苏氨酸脱氨酶是催化这个反应的PLP酶，它通过变构作用受异亮氨酸的抑制。



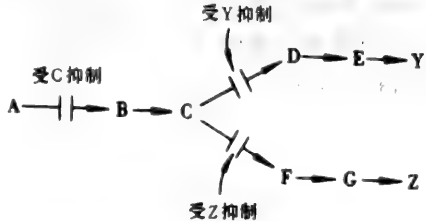
同样地，在分支酸转变为色氨酸的过程中，色氨酸抑制催化开头两步反应的酶复合物。

让我们来考虑一个分支的生物合成途径，其中Y和Z是最终产物。



假设高水平的Y或Z完全地抑制第一步共同的反应 ( $A \rightarrow B$ )。然后，即便在缺乏Z的情况下，高水平的Y也将阻止Z的合成。这样一种调节方案显然不是最理想的。事实上已经查明，在分支的生物合成途径中，有若干种复杂的控制机制：

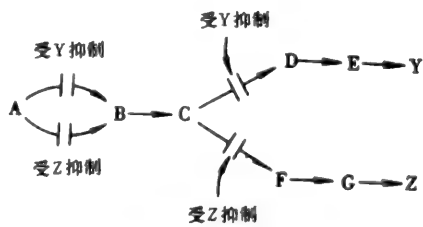
1. **顺序反馈控制** 第一步的共同反应 ( $A \rightarrow B$ ) 不直接受Y或Z的抑制。确切地说，这些最终产物抑制分支点以后所发生的反应：Y抑制  $C \rightarrow D$  这一步，而Z抑制  $C \rightarrow F$  这一步。然后高水平的C抑制  $A \rightarrow B$  反应。这样，只有当两种最终产物同时过量存在时，第一步共同反应才被封闭。



**顺序反馈控制** 调节枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中的芳香氨基酸的合成。在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸合成中，分支后的最早反应步骤分别被各自的最终产物所抑制。如果三者同时过量存在，分支酸和预苯酸就积累。这些分支点中间产物再依次抑制总途径中的第一步共同反应，即磷酸烯醇式丙酮酸和赤藓糖4-磷酸缩合。

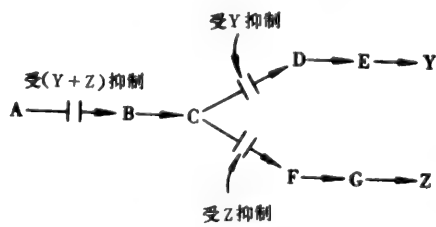
2. **酶多重性** 这个机制的突出特点是第一步共同反应 ( $A \rightarrow B$ ) 由两个不同的酶催化。

其中一个酶受Y抑制，另一个受Z抑制。因此，Y和Z必须同时以高水平存在，方能完全地阻止A转变为B。这个控制方案的其它特点与顺序反馈控制相似：即Y抑制C→D步骤，而Z抑制C→F步骤。



多重酶的区别性抑制作用控制着微生物的各种生物合成途径。在大肠杆菌中，磷酸烯醇式丙酮酸与赤藓糖4-磷酸缩合的反应是由三种不同的酶催化的。其中一种受苯丙氨酸抑制，另一种受酪氨酸抑制，第三种受色氨酸抑制。此外，还有两种不同的变位酶，它们把分支酸转变为预苯酸，其中一种酶受苯丙氨酸抑制，另一种受酪氨酸抑制。

3. 协同性反馈抑制 只有当Y和Z同时以高水平存在时，第一步共同反应（A→B）才受抑制。任何一种产物单独的高水平都不能抑制A→B这一步。和前面刚刚讨论过的两种控制方案一样，Y抑制C→D步骤，而Z抑制C→F步骤。



天冬氨酰激酶被最终产物苏氨酸和赖氨酸所抑制，是协同反馈控制的一个实例。

4. 累积性反馈控制 每一种最终产物都能部分地抑制第一步共同反应（A→B）。而每种最终产物又都是各自独立地起作用。假如高水平的Y把A→B步骤的速度从100s<sup>-1</sup>降至60s<sup>-1</sup>，而Z单独起作用时，可把反应速度从100s<sup>-1</sup>降为40s<sup>-1</sup>。那么，Y和Z同时以高水平存在时，A→B反应速度将为24s<sup>-1</sup>（0.6×0.4×100s<sup>-1</sup>）。

### 谷酰胺合成酶的活力受腺苷酰化作用的调整

大肠杆菌谷酰胺合成酶的调节作用是累积性反馈抑制的一个突出实例。请你回想一下，谷酰胺是从谷氨酸，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和ATP合成的（374页）。谷酰胺合成酶由十二个50kdal的亚基组成，它们排列成两个六边形的环，两环相对（图21-15）。这个酶是中间代谢的关键性控制要素，因为它调节氮的流动，这已为斯塔德曼，E.（Earl Stadtman）及其同事们所证明。在多种化合物如色氨酸、组氨酸、氨甲酰基磷酸、葡糖胺6-磷酸，CTP和AMP的生物合成中，谷



酰胺的酰胺基都是氮源。在谷酰胺代谢的这些最终产物中，每种都可以累积性地抑制谷酰胺合成酶，丙氨酸和甘氨酸也有抑制作用。这些抑制剂似乎每个各有专一性的结合部位。当全部八种最终产物都已与酶结合时，谷酰胺合成酶的酶活力几乎完全被封闭。

大肠杆菌谷酰胺合成酶还有另外一个重要并且有关的特点，即它的活力受可逆共价修饰的改变（图21-16）。这种控制方式在前面讨论糖原合成和降解时已曾提到过（280页）。磷酸化作用使糖原磷酸化酶激活，而使糖原合成酶失活。谷酰胺合成酶的每个亚基中有专一性的酪氨酸残基，当有一个AMP单

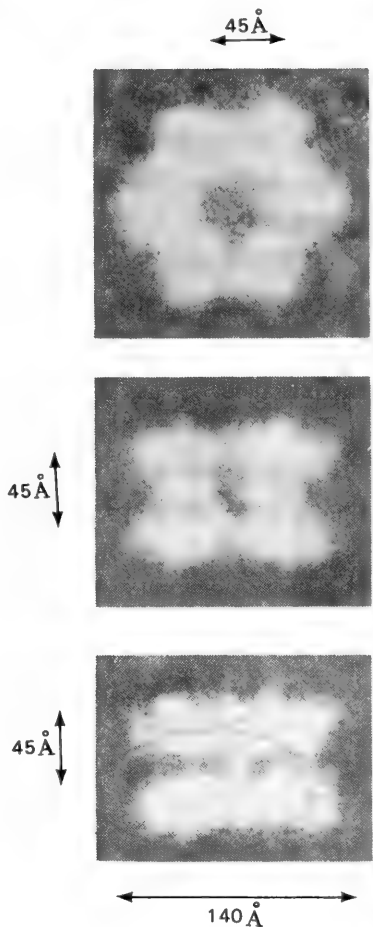
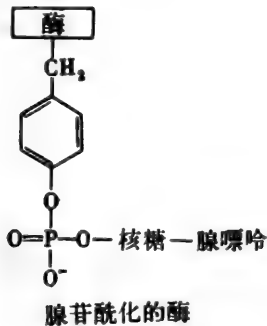


图21-15 从三个方向看大肠杆菌谷酰胺合成酶，图象是把几张电镜照片叠加后获得的。十二个亚基排列成两个六边形的环，两环相对。（蒙 Dr. Earl Stadtman 特许。）

位与该酪氨酸残基的羟基发生共价结合时，谷酰胺合成酶的活力就部分地受到调节。这种腺苷酰化的酶对累积性反馈抑制作用的敏感性比脱腺苷酰形式的酶更强。通过磷酸解作用，可

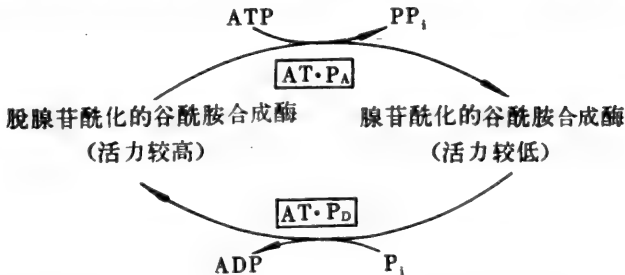


图21-16 通过可逆共价修饰控制谷酰胺合成酶的活力。腺苷酰转移酶（AT）与调节蛋白的一种形式（PA）结合，形成复合物催化腺苷酰化作用。而该酶与调节蛋白的另一形式（PD）所形成的复合物则催化脱腺苷酰化作用。

以从腺苷酰化的酶除去共价结合的AMP单位。这些反应都有一个有趣的特点，即它们都受同一个酶（腺苷酰转移酶）催化。那么是什么因素决定它起插入AMP单位的作用，或者是除去AMP单位的作用？原来腺苷酰转移酶的专一性受一个调节蛋白（符号为P）的控制，它可以 $P_A$ 和 $P_D$ 两种形式存在。 $P_A$ 和腺苷酰转移酶的复合物使AMP与谷酰胺合成酶结合，从而降低它的活力，而 $P_D$ 与腺苷酰转移酶的复合物除去AMP。这使我们看到了另一个水平上的可逆共价修饰。如图21-17所示， $P_A$ 通过与尿苷一磷酸（UMP）结合而转变为 $P_D$ 。这个反应是尿苷酰转移酶催化的，ATP和 $\alpha$ -酮戊二酸使它加强，而谷酰胺使它受抑制。然后 $P_D$ 上的两个UMP单位可以通过酶促的水解作用除掉。

这种级联式调节所造成的后果，是当活化氮的供应水平很低时，腺苷酰化作用受抑制，而脱腺苷酰化作用加强。于是谷酰胺合成酶变得对累积性反馈抑制不甚敏感，结果谷酰胺的供应增加（图21-18）。为什么要使用级联的方式来调节这个酶呢？级联的一个优点是它把信号放大，在凝血（132页）和糖原代谢的控制（284页）中也是这样。另一个可能的原因是变构控制的可能性显著增加，因为级联中的每个酶都变成了调节作用的一个独立的靶子。细胞内氮代谢的综合统一需要对大量的输入信号进行探测和加工。一个单个的蛋白质只靠自己所能完成的任务是有限的，即便像谷酰胺合成酶这样的敏感分子也是如此！演化形成的级联作用提供了多得多的调节部位，并且对细胞内氮的流动可以进行精密的调节。

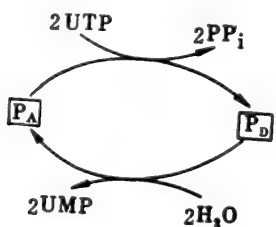


图21-17 谷酰胺合成酶的高水平级联调节。 $P_A$ 和 $P_D$ 是调节蛋白，它们控制谷酰胺合成酶的专一性，并且可以相互转变。 $P_A$ 经尿苷酰化作用转变为 $P_D$ ，这个反应又可通过水解而逆转。催化这些反应的酶可以检测代谢中间产物的浓度。

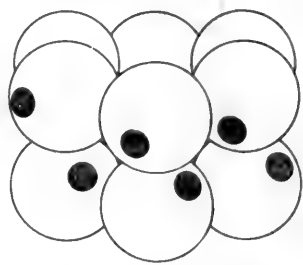


图21-18 谷酰胺合成酶的模型，示腺苷酰化作用的外围部位。  
[依据Dr. David Eisenberg惠赠的图。]

### 氨基酸是多种生物分子的前体

氨基酸是蛋白质和肽的构造单元，它们也充当多种小分子的前体，这些小分子都有重要的生物学作用。让我们简要地考查一下从氨基酸演变出来的生物分子（图21-19）。部分嘌呤和嘧啶是从氨基酸演变的。这些DNA，RNA和许多辅酶的前体的生物合成在下一章中详细讨论。在嘌呤环的九个原子中，有六个是从氨基酸演变来的，嘧啶环的六个原子中有四个来

自氨基酸。鞘氨醇是鞘脂类合成的中间产物，它的活泼的末端来自丝氨酸。组胺是强烈的血管舒张剂，它是组氨酸脱羧作用演变而成的。酪氨酸是甲状腺素（四碘甲腺原氨酸）和肾上腺素两种激素的前体，也是黑色素这种多聚色素的前体。神经递质5-羟色胺（血清素）和NAD<sup>+</sup>的尼克酰胺环是从色氨酸合成的。谷酰胺提供尼克酰胺部分的酰胺基。

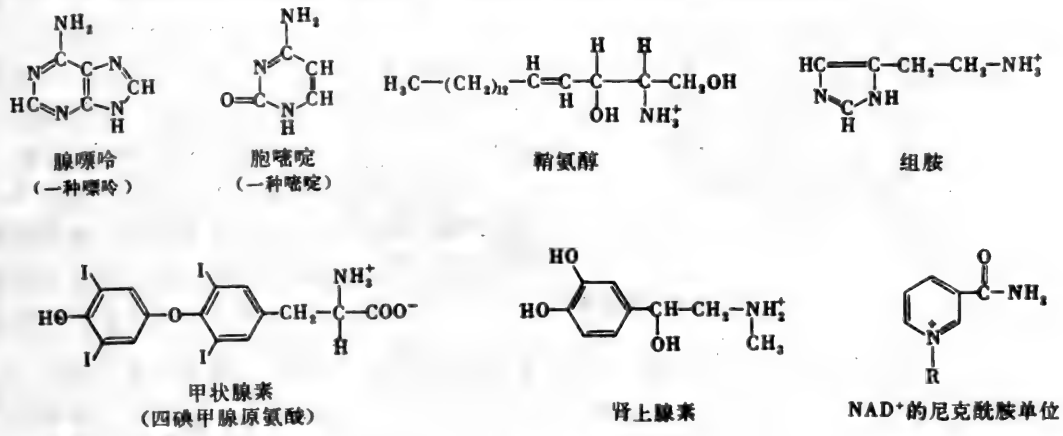


图21-19 从氨基酸演变的生物分子。

### 卟啉是从甘氨酸和琥珀酰辅酶A合成的

谢明，D. (David Shemin) 和他的同事们用同位素标记试验最早揭示，氨基酸参加血红素和叶绿素中卟啉环的生物合成。1945年他们证明，人服用<sup>15</sup>N-甘氨酸后，血红素的氮原子被标记上，而服用<sup>15</sup>N-谷氨酸则几乎不能引起标记。当时碳-14还刚刚开始可供使用，他们用碳-14发现，在鸭子的具核红细胞内，血红素的碳原子中有八个来自甘氨酸的α-碳，而没有来自羧基碳的（图21-20）。后续的研究证明，血红素的其余26个碳原子可以来自乙酸。此外，在这26个碳原子中，甲基标记乙酸分子的<sup>14</sup>C在24个碳原子中出现，而羧基标记乙酸的<sup>14</sup>C只在其余2个碳原子中出现。这种极为特殊的标记分布情况使谢明提出，甘氨酸与活化的琥珀酰化合物缩合，形成血

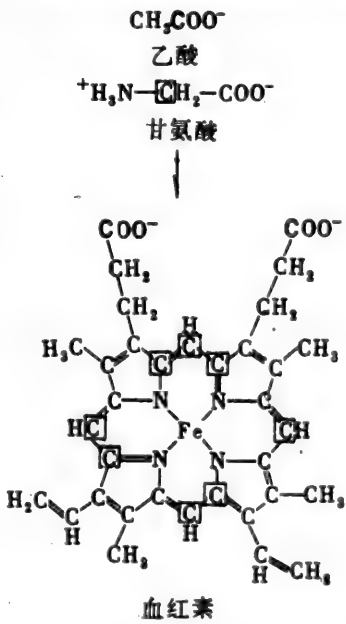
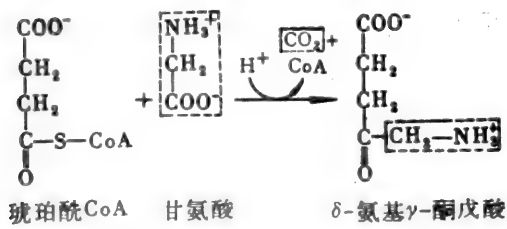
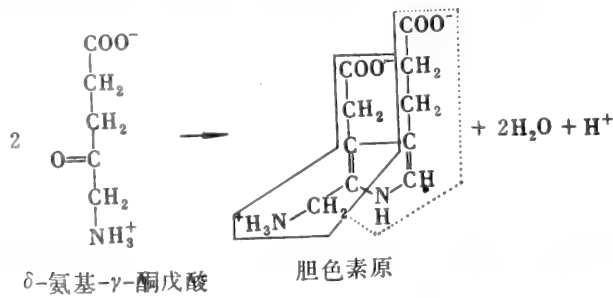


图21-20 从甘氨酸和乙酸合成血红素的标记分布情况。氮原子来自甘氨酸的氨基。碳原子的起源情况如下：主要来自乙酸的甲基碳；带方框的来自甘氨酸的α-碳；带圆的来自乙酸的羧基碳。

红素前体。事实上、卟啉生物合成中的第一步，就是甘氨酸与琥珀酰CoA 缩合,形成 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸。这个反应由 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸合成酶催化，它是线粒体内的PLP酶。可以料想得到，卟啉生物合成中这个关键步骤是可以调节的。然后两个分子的 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸缩合，形成胆色素原。这个脱水反应是由 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸脱水酶催化的。



四个胆色素原分子首尾相接，缩合成直线的四吡咯，它保持与酶相结合（图21-21）。每形成一个甲叉桥，就释放出一个铵离子。这个线性四吡咯失去 $\text{NH}_4^+$ 而环化。其环形产物是尿卟啉原Ⅲ，它具有不对称的侧链排列。这些反应需要一个合成酶和一个同合成酶。如果只有合成酶单独存在，就产生对称的异构物尿卟啉原Ⅰ。为了使其中的一个吡咯环异构化，形成不对称的尿卟啉原Ⅲ，必需有同合成酶存在。

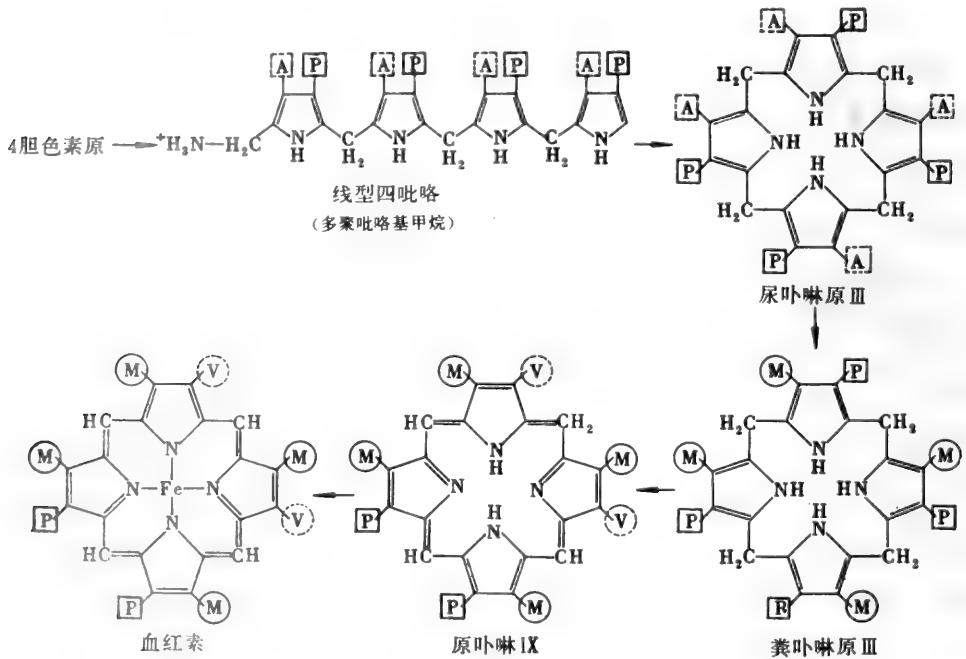


图21 21 从胆色素原合成血红素的途径。(缩写符号：A，乙酸；M，甲基；P，丙酸；V，乙烯基。)

这时卟啉的骨架已经形成。以后的反应只改变侧链和卟啉环的饱和度（图21-21）。乙酸侧链经脱羧作用形成粪卟啉原Ⅲ。卟啉环的不饱和以及两个丙酸侧链转变为乙烯基又给出原

卟啉IX(图21-22)。最后铁被螯合形成**血红素**，它是许多蛋白质诸如肌红蛋白、血红蛋白、过氧化氢酶，过氧化物酶以及细胞色素*c*等的辅基。亚铁形式的引入是由亚铁螯合酶催化的。铁在血浆内由铁传递蛋白(两个高铁离子与铁传递蛋白结合)运输，并在组织里储存于铁蛋白分子内。铁蛋白分子有很大的内腔(直径~80 Å)，可以容纳多达4500个高铁离子。

动物体内调节**血红素**生物合成的几种因子已经阐明。 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸合成酶催化本途径中的关键步骤，它也和 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸脱水酶和亚铁螯合酶一样，受**血红素**反馈抑制。调节作用也在酶合成的水平上发生。**血红素**抑制 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸合成酶的合成。最近的研究<sup>[4]</sup>出，铁原子本身也可能是活跃的调节因子。

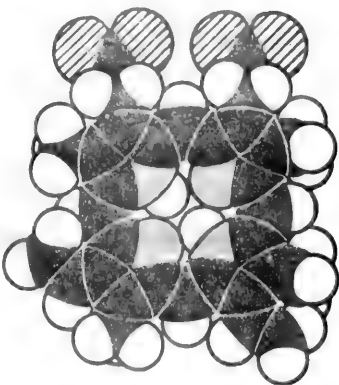
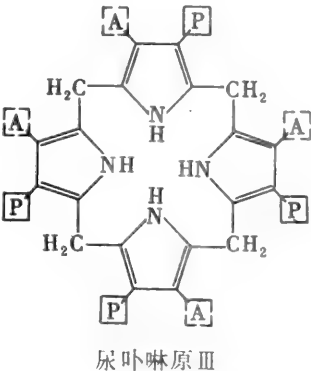
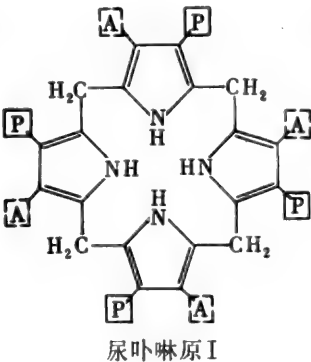


图21-22 原卟啉IX的空间填充模型，它是**血红素**的直接前体。

### 在某些遗传性的卟啉代谢紊乱症中有卟啉积累

已知有几种遗传性的卟啉代谢紊乱症。遗传性的生血性卟啉症缺乏尿卟啉原Ⅲ同合成酶，这个异构化酶使线性四吡咯环化成不对称的异构物。当尿卟啉原Ⅲ按需要量合成的同时，伴有非常大量的尿卟啉原Ⅰ形成，后者是不具生理活性的对称的异构物。尿卟啉Ⅰ、粪卟啉Ⅰ以及其它对称的衍生物也有积累。这种疾病的患者红血细胞过早地破坏，并按常染色体隐性遗传症传给后代。患者的尿是红色的，因为有大量尿卟啉Ⅰ排出。他们的牙齿在紫外线照射下发出很强的红色荧光，也是由于有卟啉沉积。此外，他们的皮肤通常对光极为敏感。

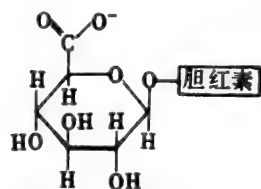


急性间发性的卟啉症是一种完全不同的疾病。因为受影响的是肝，而不是红细胞，而且皮肤也不是那么典型地对光敏感。患者的尿卟啉原合成酶活力降低，而 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸合成酶的水平有代偿性的升高。结果，肝脏中 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸和胆色素原的浓度增加，因而造成这些化合物在尿中大量排出。这种疾病是常染色体显性遗传病。突出的临床症状是间发性腹痛和神经错乱。顾名思义，这种病的临床表现是阵发性的。急性发作有时是由巴比妥盐和雌激素等药物突然引起的。

## 胆绿素和胆红素是血红素分解的中间产物

正常人的红血细胞寿命约为120天。衰老细胞离开循环,并被脾脏降解。血红蛋白的脱辅基蛋白水解成为它的氨基酸组分。血红素基团降解为胆红素的第一步(图21-23)是它的 $\alpha$ -甲叉桥断裂,形成胆绿素,后者是一个线性四吡咯。这个反应由血红素加氧酶催化。该反应有两点是特别值得注意的。首先,这个酶是单加氧酶:断裂反应需要 $O_2$ 和NADPH。其次,有一个甲叉桥碳原子以一氧化碳的形式被释放。这种内生性的CO发生在氧载体的演化中提出了一个特殊的问题(41页)。胆绿素的中心甲叉桥再被胆绿素还原酶还原,形成胆红素。

还原剂仍然是NADPH。青肿伤痕变色正是这些降解反应的表现,肉眼很易看到。



胆红素二葡萄糖苷酸  
中的一个葡萄糖醛酸单位

胆红素与血清白蛋白络合后,被运输到肝脏,在这里有糖残基与它的丙酸侧链相结合,使它变得更为易溶。这个增溶的糖是葡萄糖醛酸,它与葡萄糖的差别在于C-6有 $COO^-$ 基团,而不是 $CH_2OH$ 基团。胆红素和两个葡萄糖醛酸结合,称胆红素二葡萄糖苷酸,被分泌入胆汁。UDP-葡萄糖经氧化作用产生UDP-葡萄糖醛酸,后者是胆红素二葡萄糖苷酸合成的活化中间产物。因此,

血红素的铁原子是参加再循环的,而其有机的部分则转变成可溶性的开链形式,被排出体外。

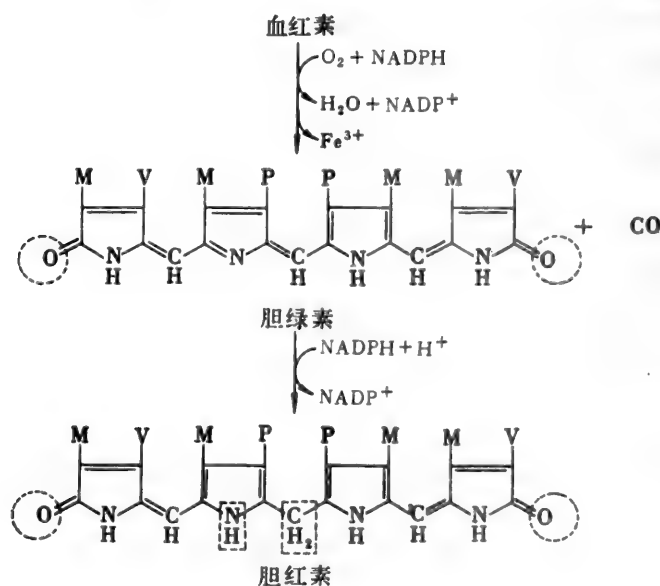


图21-23 血红素降解为胆红素。

## 概 要

微生物利用ATP和强还原剂,把 $N_2$ 转变为 $NH_4^+$ ,高等生物在氨基酸、核苷酸及其它生物分子的合成中消耗 $NH_4^+$ 。 $NH_4^+$ 进入中间代谢主要是通过谷酰胺、谷氨酸和氨甲酰磷酸。

人只能合成二十种基本氨基酸中的半数，它们被称为非必需的氨基酸，以区别于必须在饮食中提供的必需氨基酸。非必需氨基酸的合成途径很简单。谷氨酸脱氢酶催化 $\alpha$ -酮戊二酸的还原性胺化作用，形成谷氨酸。丙氨酸和天冬氨酸分别由丙酮酸和草酰乙酸经转氨作用而合成。谷酰胺是由 $\text{NH}_4^+$ 和谷氨酸合成的，天冬酰胺也可以通过类似的途径合成。脯氨酸从谷氨酸演变而成。丝氨酸由3-磷酸甘油酸形成，它是甘氨酸和半胱氨酸的前体。酪氨酸是由必需氨基酸苯丙氨酸经羟化作用合成的。必需氨基酸的生物合成途径比非必需氨基酸要复杂得多。这些途径多数由反馈抑制来调节，其中的关键步骤受最终产物的变构性抑制。大肠杆菌谷酰胺合成酶的调节提供了一个突出的范例，它说明累积性反馈抑制以及通过级联性可逆共价修饰的控制作用。

四氢叶酸是活化一碳单位的载体，它在氨基酸代谢和核苷酸代谢中起重要作用。这个辅酶可以在三种不同氧化状态下携带一碳单位，三种氧化状态可以相互转变：最还原态——甲基；中间态——亚甲基；最氧化态——甲酰基，亚胺甲基和次甲基。活化甲基的主要供体是S-腺苷甲硫氨酸，它是通过ATP的腺苷基转移给甲硫氨酸的硫原子而合成的。当活化的甲基转移给一个受体时，就有S-腺苷高半胱氨酸形成。它经水解作用产生腺苷和高半胱氨酸，高半胱氨酸再甲基化成甲硫氨酸，完成活化甲基循环。

氨基酸是多种生物分子的前体。卟啉是从甘氨酸和琥珀酰CoA合成的，它们缩合产生 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸。这个中间产物再自身缩合，形成胆色素原。四个胆色素原分子互相结合形成直线的四氢吡咯，四氢吡咯再环化成尿卟啉原Ⅲ。氧化作用和侧链修饰导致原卟啉Ⅸ的合成，原卟啉Ⅸ获得一个铁原子而形成血红素。 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸合成酶催化该途径中关键步骤，血红素对这个合成酶有反馈抑制。

## 习 题

1. 请写出平衡的方程式，表示从葡萄糖合成丙氨酸。
2. 在从 $\text{N}_2$ 到血红素的氮流动过程中，中间产物是什么？
3. 请写出在下列转变中，参加反应的叶酸衍生物：
  - (a) 甘氨酸——丝氨酸
  - (b) 组氨酸——谷氨酸
  - (c) 高半胱氨酸——甲硫氨酸
4.  $^{18}\text{O}$ 标记研究表明：在谷酰胺合成酶催化的反应中，有一个氧原子从谷氨酸的侧链转移给正磷酸。请为此发现提出解释。
5. 异戊酸血症是一种遗传性的亮氨酸代谢紊乱症，它是由于缺乏异戊酰-CoA脱氢酶引起的。许多患这种疾病的婴儿在出生后的一个月之内死亡。最近有报导对两名患儿施用大量甘氨酸取得明显的临床改善。使用甘氨酸疗法的理论基础是什么？
6. 在强还原剂 $\text{D}_2$ 和ATP的存在下，固氮酶催化HD的形成。此外，H-D交换还依赖于 $\text{N}_2$ 的存在。为了解释这些现象，请提出 $\text{N}_2$ 固定中的一个中间产物。
7. 在缺氮和硝酸盐的情况下，蓝绿藻形成异形细胞，它们没有细胞核，并且附接于相邻的营养细胞。异形细胞有光合系统Ⅰ活力，但完全没有光合系统Ⅱ活力。它们的功能是什么？

## 第22章 核苷酸的生物合成

本章讨论核苷酸的生物合成。这些化合物几乎参与所有的生物化学过程:

1. 它们是 **DNA** 和 **RNA** 的活化前体。
2. 核苷酸衍生物是许多生物合成中的活化中间产物。例如, UDP-葡萄糖和 CDP-二酰基甘油分别为糖原和磷酸甘油酯的前体。
3. 腺嘌呤核苷酸如 ATP 是生物体系中普遍通用的能量货币。
4. 腺嘌呤核苷酸是三大辅酶:  $\text{NAD}^+$ , FAD 和 CoA 的组分。
5. 核苷酸是代谢调节物。环 AMP 是许多激素作用的普遍存在的媒介。ATP 引起的共价修饰可以改变某些酶的活性。如糖原合成酶的磷酸化作用及谷酰胺合成酶的腺苷酰化作用都是具体的实例。

### 碱基、核苷和核苷酸的命名法

核苷酸由一个含氮碱基, 一个糖和一个或多个磷酸基组成。含氮碱基是嘌呤或嘧啶的衍生物。两种主要的嘌呤是腺嘌呤和鸟嘌呤, 三种主要的嘧啶是胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶 (图 22-1)。

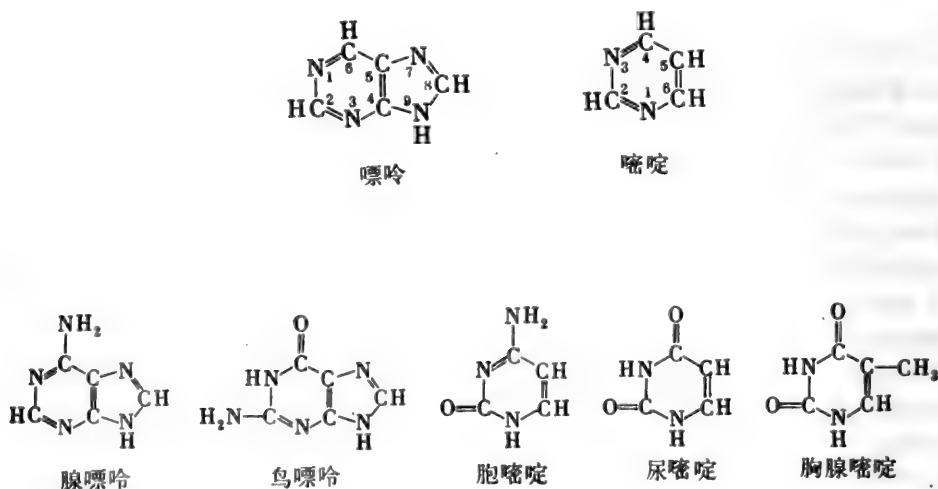
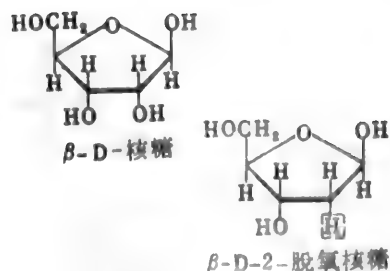


图 22-1 主要嘌呤和嘧啶的结构。

核苷由一个嘌呤或嘧啶碱基与一个五碳糖结合而成。五碳糖是 **D-核糖** 或 **2-脱氧-D-核糖**。在核苷中, 五碳糖的 C-1 碳原子与嘧啶碱基的 N-1 或嘌呤碱基的 N-9 结合成糖苷键。在所有天然存在的核苷中, 这个 N-糖苷键都是  $\beta$  构型的。





在核苷中的五碳糖是核糖，而在脱氧核苷中则是脱氧核糖。主要的核苷是腺苷、鸟苷，尿苷和胞苷（图22-2）；主要的脱氧核苷是脱氧腺苷，脱氧鸟苷，脱氧胸苷和脱氧胞苷（图22-3）。请注意在脱氧核苷中，尿嘧啶被它的甲基化的类似物胸腺嘧啶所取代。

核苷酸是核苷的磷酸酯。在核苷酸中，五碳糖部分至少有一个羟基酯化。最常见的酯化位置是与五碳糖上C-5'相连接的羟基。这样一种化合物称为

核苷5'-磷酸或称5'-核苷酸。右上角带撇的数码代表五碳糖的原子，而不带撇的数码代表嘌呤或嘧啶环上的原子。五碳糖的种类由名称加前缀来表示，如5'-核苷酸和5'-脱氧核苷酸。

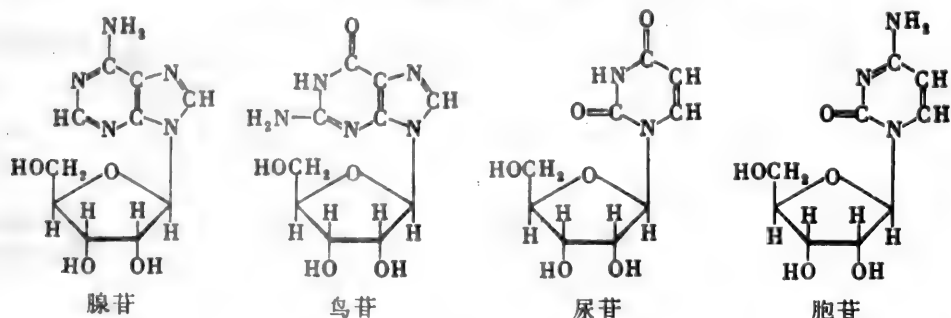
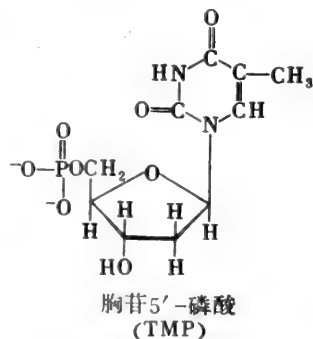
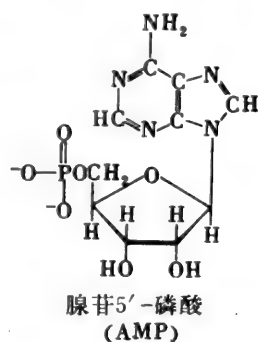


图22-2 主要核苷的结构。

腺苷的5'-羟基酯化，演变成的核苷酸是腺苷5'-磷酸，常称为腺苷酸。有时也用腺苷磷酸这个名称，但人们更喜欢用腺苷酸，因为在生理pH的条件下，磷酸根解离。这个化合物的标准缩写法是AMP（代表腺苷一磷酸）。其它主要5'-核苷酸的常用名是鸟苷酸（GMP），尿苷酸（UMP）和胞苷酸（CMP）。主要的5'-脱氧核苷酸称为脱氧腺苷酸（dAMP），脱氧鸟苷酸（dGMP），脱氧胸苷酸（dTMP）和脱氧胞苷酸（dCMP）。它们的缩写符号中第一个字母d，是为了表示它们是2'-脱氧核苷酸。

在核苷5'-二磷酸中，二磷酸基团与五碳糖的5'-羟基酯化，而在核苷5'-三磷酸中，则由三磷酸基团与这个羟基相连。因此，腺嘌呤核苷酸系列的化合物称为腺苷5'-一磷酸（AMP），腺苷5'-二磷酸（ADP）和腺苷5'-三磷酸（ATP）。相应的脱氧核苷酸是脱氧腺苷5'-一磷酸（dAMP），脱氧腺苷5'-二磷酸（dADP）和脱氧腺苷5'-三磷酸（dATP）。碱基、核苷和核苷酸的命名法总结如表22-1。



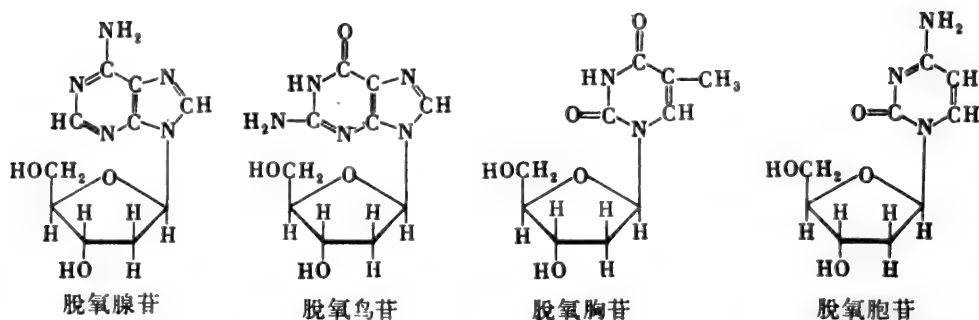


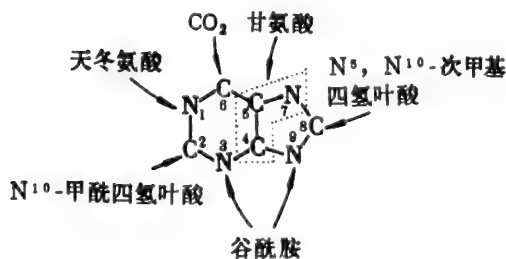
图22-3 主要脱氧核苷的结构。

表22-1 碱基、核苷和核苷酸的命名法

碱 基	核 苷	核苷酸 (5'—磷酸)
腺嘌呤 (A)	腺 苷	腺苷酸 (AMP)
鸟嘌呤 (G)	鸟 苷	鸟苷酸 (GMP)
尿嘧啶 (U)	尿 苷	尿苷酸 (UMP)
胞嘧啶 (C)	胞 苷	胞苷酸 (CMP)
碱 基	脱氧核苷	脱氧核苷酸 (5'—磷酸)
腺嘌呤 (A)	脱氧腺苷	脱氧腺苷酸 (dAMP)
鸟嘌呤 (G)	脱氧鸟苷	脱氧鸟苷酸 (dGMP)
胸腺嘧啶 (T)	脱氧胸苷	脱氧胸苷酸 (dTMP)
胞嘧啶 (C)	脱氧胞苷	脱氧胞苷酸 (dCMP)

嘌呤环是从氨基酸、四氢叶酸衍生物和  $\text{CO}_2$  合成的

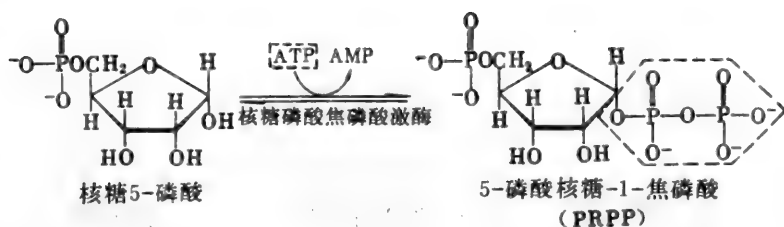
嘌呤核苷酸中的嘌呤环是从多种前体组装而成的 (图22-4)。甘氨酸提供C-4，C-5和N-7。N-1原子来自天冬氨酸。另外两个氮原子N-3和N-9来自谷酰胺侧链的酰胺基。四氢叶酸的活化衍生物供给C-2和C-8，而 $\text{CO}_2$ 则是C-6的来源。



PRPP 是核苷酸中核糖磷酸部分的供体

图22-4 嘌呤环中各原子的来源。

嘌呤生物合成的途径是在本世纪50年代由布坎南, J. (John Buchanan)、格林伯格, G.R. (G. Robert Greenberg) 等阐明的。嘌呤和嘧啶核苷酸的核糖磷酸部分来自5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (PRPP)，它是组氨酸和色氨酸生物合成中的关键性中间产物。PRPP是从ATP和核糖5-磷酸合成的，核糖5-磷酸主要由戊糖磷酸途径产生 (254页)。焦磷酸基团从ATP转移到核糖5-磷酸的C-1。PRPP具有 $\alpha$ 构型。



嘌呤环在组装过程中与  
核糖磷酸相连接

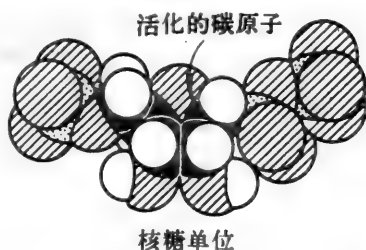
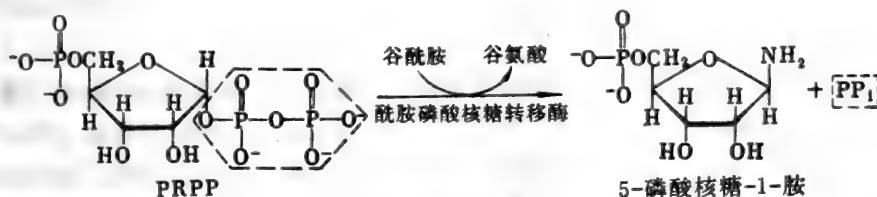


图22-5 5-磷酸核糖-1-焦磷酸 (PRPP) 的空间填充模型, 在核苷酸生物合成中, PRPP是糖单位的活化供体。

在嘌呤核苷酸的从头合成中, 关键步骤是从 PRPP (图22-5) 和谷酰胺形成5-磷酸核糖胺。谷酰胺侧链的氨基取代了与 PRPP 的 C-1 连接的焦磷酸基团。在这个反应里, C-1 从  $\alpha$  构型转变为  $\beta$  构型。由此形成的 C-N 糖苷键具天然核苷酸所特有的  $\beta$  构型。这个反应由焦磷酸的水解向前驱动。



甘氨酸与磷酸核糖胺结合, 产生甘氨酸酰胺核苷酸 (图22-6)。在甘氨酸的羧基和磷酸核糖胺的氨基之间形成酰胺键时, 消耗一个 ATP 分子。然后甘氨酸残基的  $\alpha$ -氨基末端被次甲四氢叶酸甲酰化, 产生  $\alpha$ -N-甲酰甘氨酸酰胺核苷酸。这个化合物中的酰胺基转变为脒基。氮原子是谷酰胺侧链贡献的, 这个反应消耗一分子 ATP。甲酰甘氨酸脒核苷酸再经闭环作用, 形成5-氨基咪唑核苷酸。这个中间产物含有嘌呤骨架的完整的五员环。

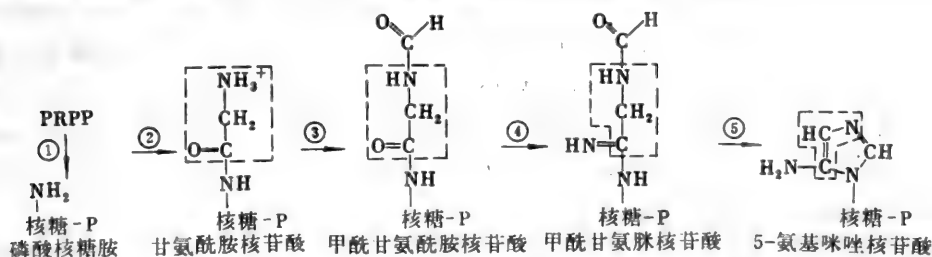


图22-6 嘌呤生物合成的第一阶段。从 PRPP 形成 5-氨基咪唑核苷酸。这些反应的本质是 (1) PP<sub>i</sub> 被谷酰胺侧链氨基取代, (2) 甘氨酸加成, (3) 次甲四氢叶酸实现甲酰化, (4) 从谷酰胺转移一个氮原子, 和 (5) 脱水 and 闭环。

嘌呤骨架合成的下一个阶段是形成六员环，它以此为起点（图22-7）。环内六个原子中有三个已经在氨基咪唑核苷酸中存在，另外三个来自 $\text{CO}_2$ 、天冬氨酸和甲酰四氢叶酸。六员环中的下一个碳原子是通过氨基咪唑核苷酸的羧化而引入的，形成**5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸**。

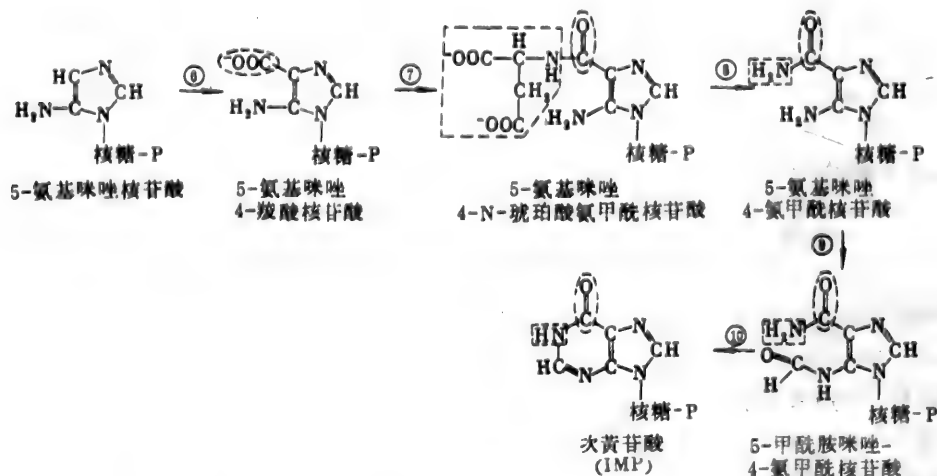


图22-7 嘌呤生物合成的第二阶段：从5-氨基咪唑核苷酸形成次黄苷酸。这些反应的本质是(6)羧化作用，

(7)天冬氨酸的加成，(8)除去延胡索酸（留下天冬氨酸的氨基），(9) $\text{N}^{10}$ -甲酰四氢叶酸实现甲酰化，和(10)脱水 and 闭环。

然后天冬氨酸的氨基与这个中间产物的羧基反应，形成**5-氨基咪唑-4-N-琥珀酸氨甲酰核苷酸**。这个酰胺键的形成消耗一个ATP分子。在下一步反应中，天冬氨酸部分的碳骨架以延胡索酸的形式脱落下来，产生**5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸**。请注意这两个反应的结果是把一个羧酸转变为一个酰胺。因此，天冬氨酸只将它自己的氮原子贡献给嘌呤环。嘌呤环的最后一个原子是由 $\text{N}^{10}$ -甲酰四氢叶酸贡献的。由此产生的**5-甲酰胺咪唑-4-氨甲酰核苷酸**再经脱水和闭环作用，而形成含有完整嘌呤环的**次黄苷酸 (IMP)**。次黄苷酸的嘌呤碱基部分称为**次黄嘌呤**。

## AMP和GMP是从IMP形成的

次黄苷酸是AMP和GMP的前体(图22-8)。**腺苷酸**从次黄苷酸合成，是通过在C-6插入一个氨基，来代替羰基氧原子。天冬氨酸先加成，然后除去延胡索酸，从而再次由天冬氨酸贡献自己的氨基。在从次黄苷酸和天冬氨酸合成**腺苷酸琥珀酸**的过程中，GTP是高能磷酸键的供体。从腺苷酸琥珀酸除去延胡索酸，和从5-氨基咪唑-4-N-琥珀酸氨甲酰核苷酸除去延胡索酸这两个反应都是由同一个酶催化的。

**鸟苷酸 (GMP)** 合成的第一步是次黄苷酸被氧化，继而在C-2加入一个氨基。在次黄苷酸氧化成黄苷酸 (XMP) 时， $\text{NAD}^+$ 是氢的受体。然后谷酰胺侧链中的氨基转移给黄苷酸。这个反应消耗两个高能磷酸键，因为ATP分解为AMP和 $\text{PP}_i$ ，后者随即水解。

在次黄苷酸转变为腺苷酸和鸟苷酸的过程中，一个羰基氧原子为一个氨基所取代。与此相类似的变化在甲酰甘氨酸核糖核苷酸从它的酰胺前体合成时（397 页第 4 步）也有发生，另

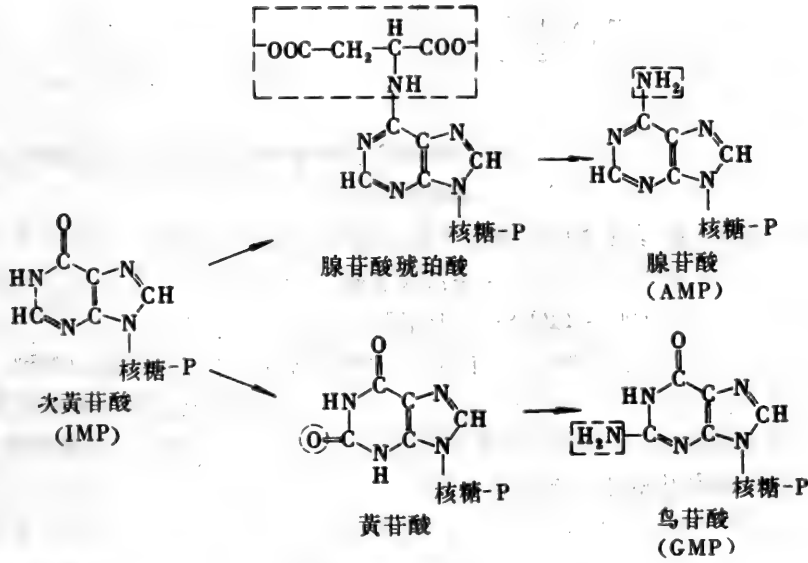


图 22-8 AMP和GMP是从IMP合成的。

外在CTP从UTP合成时（403 页）以及在豚循环中瓜氨酸转变为精氨酸时（315 页），也都有发生。这些反应的机制的共同基调是羰基氧原子转变为一个很容易被氨基取代的衍生物。羰基的互变体形式与ATP（或GTP）反应，形成磷酰酯，胺与磷酰酯发生亲核反应（图22-9）。然后无机磷酸从这个四面体的加合物上排除，使反应完成。起反应的胺可以是 $\text{NH}_3$ 、谷酰胺的侧链酰胺基或天冬氨酸的 $\alpha$ -氨基。在这一类反应中，离开的基团可以是 $\text{P}_i$ 、 $\text{PP}_i$ 或AMP部分。例如，在从PRPP合成5-磷酸核糖-1-胺时， $\text{PP}_i$ 就被谷酰胺的氨基所取代（397 页）。

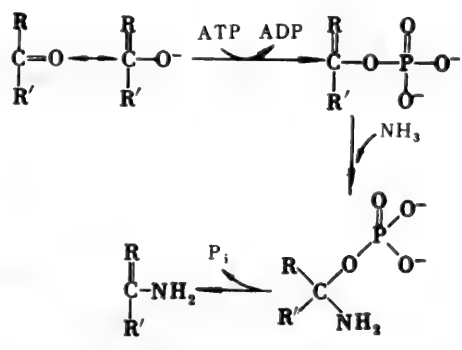
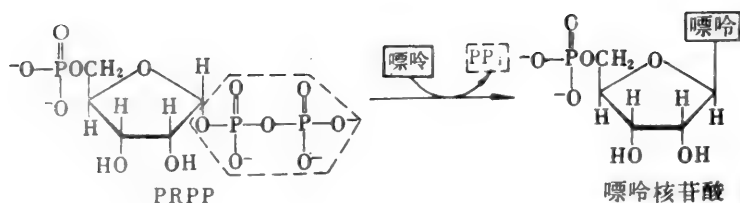


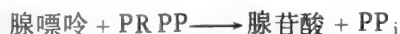
图 22-9 羰基氧被氨基取代的反应机制。

嘌呤碱基可以通过利用PRPP的补救反应再循环

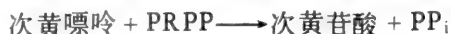
自由的嘌呤碱基是由核酸和核苷酸经过水解性的降解而形成的。嘌呤核苷酸可以通过补救反应从这些事先形成的碱基合成，补救反应比上面讨论过的从头合成途径的反应简单，而且也廉价得多。在补救反应里，PRPP的核糖磷酸部分转移给嘌呤，形成相应的核苷酸：



有两种补救酶，它们的专一性各不相同。腺嘌呤磷酸核糖转移酶催化腺苷酸的合成：



而次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶催化次黄苷酸和鸟苷酸的合成：



这样灵活而又有效地利用嘌呤环，在组氨酸的生物合成中也可明显地看到。ATP的嘌呤环的六员环部分贡献组氨酸咪唑环的一部分（384页）。嘌呤骨架的其余部分也并不丢弃掉，实际上它在5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸中保存起来。5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸是嘌呤生物合成的从头合成途径中的中间产物。

### AMP和GMP是嘌呤核苷酸生物合成的反馈抑制剂

嘌呤核苷酸的合成在几个地方受反馈抑制作用的控制（图22-10）。

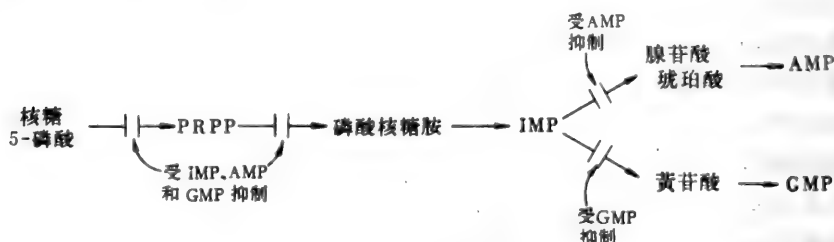


图22-10 嘌呤生物合成的控制。

1. 嘌呤核苷酸对5-磷酸核糖-1-焦磷酸合成酶的反馈抑制作用调节PRPP的水平。这个合成酶受AMP，GMP和IMP的抑制。

2. 嘌呤核苷酸生物合成的关键步骤，是通过谷酰胺侧链氨基转移使PRPP转变为磷酸核糖胺。谷酰胺PRPP酰胺基转移酶受许多嘌呤核苷酸的反馈抑制。值得注意的是途径中的最终产物AMP和GMP在抑制这个酶的活力方面，有互相增效的作用。

3. 次黄苷酸是AMP和GMP合成中的分支点。次黄苷酸以后的反应是反馈抑制起作用的地方。AMP抑制次黄苷酸转变为腺苷酸琥珀酸，而腺苷酸琥珀酸正是次黄苷酸本身的直接前体。与此相类似的情况，是GMP抑制次黄苷酸转变为黄苷酸，而黄苷酸也是次黄苷酸的直接前体。

4. GTP是AMP合成中的底物，而ATP是GMP合成中的底物，这种交互的底物关系有助于平衡腺苷酸和鸟苷酸的合成。

嘧啶环是由氨甲酰磷酸和天冬氨酸合成的

和嘌呤核苷酸从头合成的反应顺序相反，嘧啶环先组装好，然后再与核糖磷酸结合，形成嘧啶核苷酸。PRPP既是嘌呤核苷酸合成中的核糖磷酸供体，也是嘧啶核苷酸合成中的核糖磷酸供体。嘧啶环的前体是氨甲酰磷酸和天冬氨酸（图22-11）。

嘧啶的合成从形成氨甲酰磷酸开始，氨甲酰磷酸也是尿素合成中的一个中间产物（315页）。在真核生物中，这个活化的氨甲酰供体的合成是区域化的。在合成嘧啶时所消耗的氨甲酰磷酸在胞液内形成，而在尿素合成中消耗的氨甲酰磷酸则在线粒体内形成（316页）。有两个不同的氨甲酰磷酸合成酶。另一个值得注意的差别是氨甲酰磷酸在胞液内合成时，氮的供体是谷酰胺，而不是 $\text{NH}_4^+$ 。



嘧啶生物合成的关键步骤是从天冬氨酸和氨甲酰磷酸形成N-氨甲酰天冬氨酸。这个氨甲酰化作用由天冬氨酸转氨甲酰酶催化，该酶是一个特别有趣的调节酶（403页）。

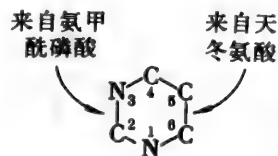
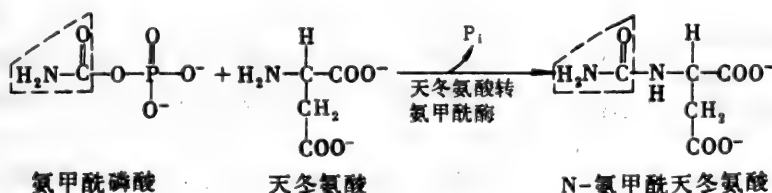
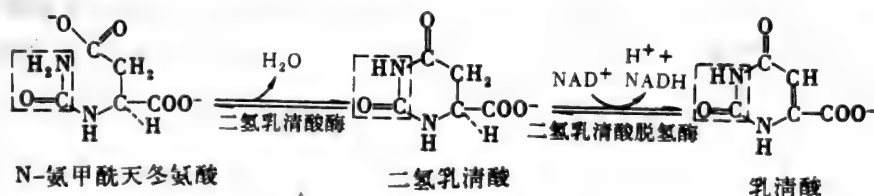


图22-11 嘧啶环中各原子的起源。  
C-2和N-3来自氨甲酰磷酸，  
而环中其它原子均来自天冬氨酸。



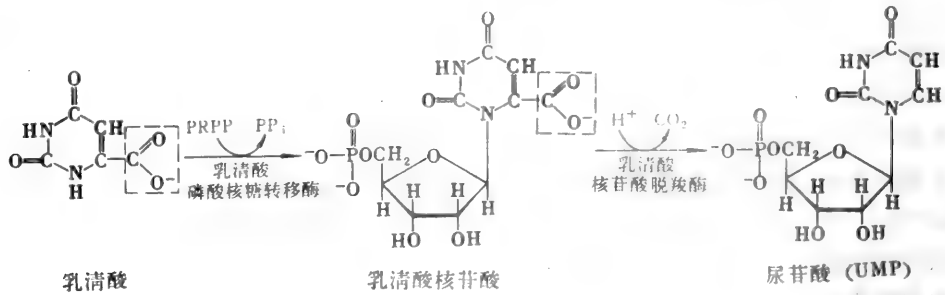
嘧啶环在下一步反应中形成，这时氨甲酰天冬氨酸环化，并且失水，产生二氢乳清酸。然后二氢乳清酸通过脱氢作用而形成乳清酸。



乳清酸从PRPP获得核糖磷酸部分

嘧啶核苷酸合成的下一步是获得核糖磷酸基团。乳清酸（一种自由的嘧啶）与PRPP反应，形成乳清酸核苷酸（一种嘧啶核苷酸）。这个反应由乳清酸核苷酸焦磷酸酶催化，由焦磷酸

水解作用所驱动。乳清酸核苷酸然后再经脱羧作用产生尿苷酸（UMP），它是一个主要的嘧啶核苷酸。



### 一条单一多肽链含有嘧啶生物合成的前三种酶

在大肠杆菌中，从简单前体合成UMP的六种酶似乎是不缔合的。与此相反，在高等生物里，其中有几种酶形成多酶复合物。用N-（磷酸乙酰）-L-天冬氨酸（PALA）处理培养的哺乳类细胞可以获得大量的这种多酶复合物，PALA是天冬氨酸转氨甲酰酶（ATC酶）的潜在的抑制剂。它与ATC酶紧密结合（ $K_i = 10^{-8} \text{ mol/L}$ ），因为它具有催化作用中过渡态的某些结构特征（图22-12）。存活下来的细胞克服PALA的抑制效果，是通过比正常细胞多合成一百倍的ATC酶。氨甲酰磷酸合成酶和二氢乳清酸酶的水平也都升高一百倍，但是那些催化嘧啶生物合成中后续步骤的酶则数量几乎不变。这些观察引导人们发现，氨甲酰磷酸合成酶、天冬氨酸转氨甲酰酶和二氢乳清酸酶在一条200kda的多肽链上共价连结。乳清酸磷酸核糖转移酶和乳清酸核苷酸脱羧酶是催化嘧啶生物合成中最后两步的酶，它们形成另一个复合物。它们也可能是共价连结的。请回忆，酵母脂肪酸合成酶复合物是由两类多肽链构成的，每条链含有几个酶（306页）。功能上相关的酶之间发生共价结合，也可能在真核生物中是相当普遍存在的。这样一种安排会有利于组装一个多酶复合物。几个酶在一条多肽链上还可能有一种优越性，即它们会按照等摩尔量合成。

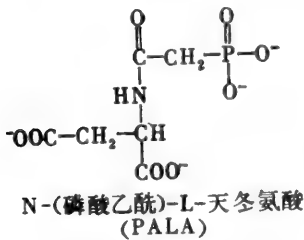


图22-12 PALA的结构，PALA是ATC酶的潜在抑制剂。

核苷一磷酸、二磷酸和三磷酸可以相互转变

在生物合成和能量转换中，核苷酸的活泼形式是二磷酸和三磷酸。专一性的核苷单磷酸激酶使核苷一磷酸转变，这些激酶利用ATP做磷酸基供体。例如，UMP激酶使UMP磷酸化。



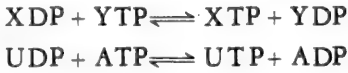
腺苷酸激酶（又称肌激酶）使AMP，ADP和ATP相互转变。这些反应的平衡常数接近于1。



核苷二磷酸激酶使核苷二磷酸和核苷三磷酸相互转变，与单磷酸激酶相比，这个二磷酸激酶

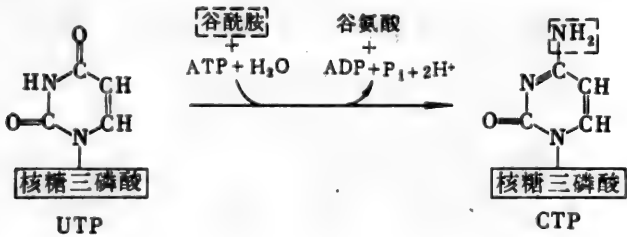


有广泛的专一性。在下面的方程式中，X和Y可以是若干核苷或脱氧核苷中的任意一种。例如：



UTP经胺化作用形成CTP

胞苷三磷酸（CTP）是由尿苷三磷酸（UTP）演变而来的，尿苷三磷酸是另一种主要的嘧啶核苷酸。C-4的羰基氧被一个氨基所取代。在哺乳类动物中，谷酰胺的侧链是氨基的供体，而在大肠杆菌中，这个反应利用NH<sub>4</sub><sup>+</sup>。在两个胺化反应中，都消耗一个ATP分子。



嘧啶核苷酸生物合成受反馈抑制作用的调节

大肠杆菌嘧啶核苷酸生物合成的关键步骤是从天冬氨酸和氨甲酰磷酸形成 N-氨甲酰天冬氨酸。天冬氨酸转氨甲酰酶催化这个反应，并为此途径的最终产物 CTP 所反馈抑制。另一个控制场所是氨甲酰磷酸合成酶，它受 UMP 的反馈抑制（图22-13）。

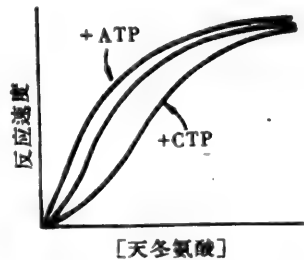
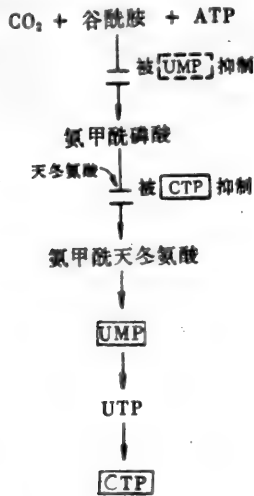


图22-14 天冬氨酸转氨甲酰酶的变构效应，ATP是激活剂，而CTP是抑制剂。 [引自J.C.Gerhart, Curr.Top.Cell Regul,2(1970): 275.]

图22-13 嘧啶生物合成的控制。

格哈特, J. (John Gerhart) 和沙克门, H. (Howard Schachman) 深入地研究了ATC酶的变构性质。氨甲酰磷酸与天冬氨酸结合是协同的, 这反映在反应速度与底物浓度之间的S形相关曲线上 (图22-14)。CTP通过降低酶对底物的亲和力来抑制酶的活性, 而不影响它的 $V_{max}$ 。CTP施加抑制作用的程度可以高达90%, 它依赖于底物的浓度。与此相反, ATP是ATC酶的激活剂。ATP可以加强酶对底物的亲和力, 而 $V_{max}$ 不受影响。此外, ATP及CTP对ATC酶调节部位的结合是竞争性的。高水平的ATP把CTP从酶上取代下来, 从而使CTP不能发挥它的抑制效果。

ATP使ATC酶活化具有双重的生物学意义。首先, 它有助于使嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸形成的速度相等。核酸合成对这两类核苷酸的需要量大体相等。其次, ATP的活化作用是一种信号, 表明它可以作为底物被用于嘧啶核苷酸生物合成的某些反应, 如氨甲酰磷酸的合成及UMP经磷酸化成为UTP。

### 天冬氨酸转氨甲酰酶由可被分开的催化亚基和调节亚基组成

ATC酶用汞制剂如对-羟基苯甲酸汞处理之后, 它的调节性能消失。ATP和CTP对它的催化活力不再产生任何影响。此外, 它与底物的结合变得不再是协同性的。但是, 这种经过改变的酶仍然保持全部的催化活力。这种失去调节性质而保留酶活力的现象称为脱敏作用。

超速离心研究表明, 在汞制剂使ATC酶脱敏的同时, 还伴有酶离解为两种亚基的现象 (图22-15)。天然酶的沉降系数为11.6S, 而解离成两种亚基的沉降系数为2.8S和5.8S。这些亚基很容易通过离子交换层析法分开, 因为它们的荷电情况明显不同; 也很容易用蔗糖密度梯度离心法分开, 因为它们的大小也不同。在亚基分开之后, 可以除去离解剂对-羟基苯甲酸汞。较大的亚基称为催化亚基, 它有催化活力。但是, 分离的催化亚基的活力不受ATP和CTP的影响。较小的亚基称为调节亚基, 它没有催化活力, 但含有与CTP和ATP结合的专一性结合部位。催化亚基由三条34kdal多肽链构成, 而调节亚基由两条17kdal的多肽链组成。

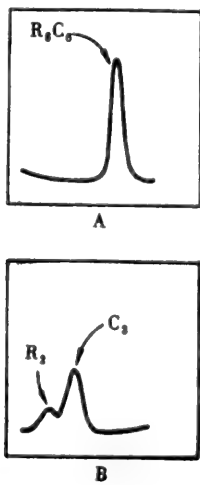


图22-15 (A)天然ATC酶和(B)酶被汞制剂离解为调节亚基和催化亚基后的沉降速度曲线。[依据J.C. Gerhart和H.K. Schachman, *Biochemistry* 4 (1965): 1054.]

较大的亚基称为催化亚基, 它有催化活力。但是, 分离的催化亚基的活力不受ATP和CTP的影响。较小的亚基称为调节亚基, 它没有催化活力, 但含有与CTP和ATP结合的专一性结合部位。催化亚基由三条34kdal多肽链构成, 而调节亚基由两条17kdal的多肽链组成。

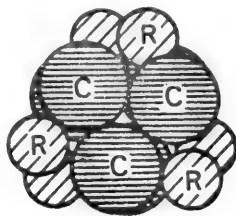
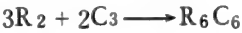


图22-16 天冬氨酸转氨甲酰酶的催化亚基(C, 用横线圆表示)和调节亚基(R, 用斜线圆表示)的排列方式。[依据Dr. William Lipscomb惠赠的图。]

当催化亚基与调节亚基混合时，它们迅速结合。由此形成的复合物具有与天然酶相同的  $R_6C_6$  结构。



此外，重组的酶具有与天然酶完全相同的变构性质。

在利普斯科姆, W. (William Lipscomb) 的实验室里, 正在进行着ATC酶的x射线晶体学研究。分辨率为3.0Å的电子密度图表明, 三个调节性的二聚物 ( $R_2$ ) 形成一条赤道带, 两个催化性的三聚物 ( $C_3$ ) 分布在赤道带的上面和下面 (图22-16, 图22-17)。这个分子的突出特点是它含有一个大的中心腔, 有若干渠道都可以通到这个中心腔。指明CTP的变构部位远离催化部位是十分有趣的。

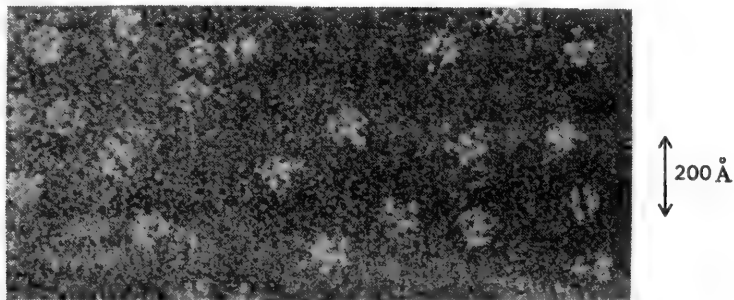


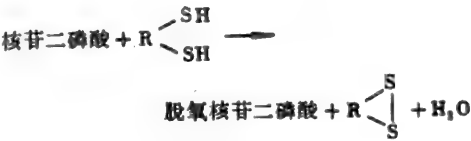
图22-17 天冬氨酸转氨甲酰酶的电镜照片。[蒙Dr.Robley C.Williams特许。]

### 脱氧核苷酸由核糖核苷二磷酸经还原作用而合成

我们现在转向讨论脱氧核苷酸的合成。这些DNA前体是由核苷酸还原而形成的。核糖部分的2'-羟基为氢原子所取代。在大肠杆菌和哺乳类动物中, 这个反应的底物是核苷二磷酸。总的化学计算关系是

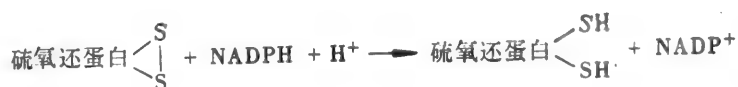


实际反应机制要比这个方程式所表达的机制复杂得多。赖卡德, P. (Peter Reichard) 已经证明, 在大肠杆菌中, NADPH的电子通过一系列的巯基转移给底物。核苷酸还原酶 (又称核苷二磷酸还原酶) 催化最后阶段, 它的化学计算关系是



这个酶由B1 (160 kdal的二聚物) 和B2 (78 kdal的二聚物) 两个亚基构成。B1亚基含有与核苷酸底物及变构效应物相结合的结合部位。此外B1还含有巯基, 后者充当核糖单位还原中的直接电子供体。B2是一个铁-硫蛋白, 它通过在酪氨酸残基的芳香环上形成一个不寻常的自由基而参加催化作用。B1和B2亚基共同形成酶的活力部位 (图22-18)。

电子如何从NADPH转移到核苷酸还原酶催化部位的巯基？还原能力的一个载体是**硫氧还蛋白**，它是一个12kdal的蛋白质，具有两个相互紧密靠近的半胱氨酸残基(图22-19)。这些巯基在由核苷酸还原酶催化的反应中氧化成二硫化物。然后还原的硫氧还蛋白再通过NADPH与氧化的硫氧还蛋白反应而获得再生。这个反应由**硫氧还蛋白还原酶**催化，后者是一个**黄素蛋白**。



硫氧还蛋白曾经一度被认为是把还原能力带给核苷酸还原酶的唯一载体。但是，人们发现，一个完全缺乏硫氧还蛋白的大肠杆菌突变体也能形成脱氧核苷酸。这个惊人的观察引导人们分离出第二个载体体系。这个突变体的电子供体被证明是**谷胱甘肽**，它是一个含有半胱氨酸的三肽。正如前面曾经讨论过的那样(264页)，**谷胱甘肽还原酶**催化NADPH使氧

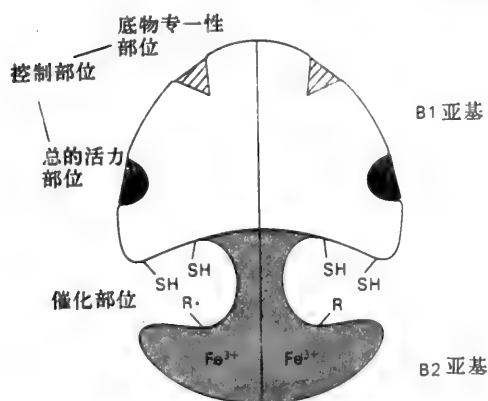


图22-18 大肠杆菌核苷酸还原酶的模型。[依据L. Thelander和P. Reichard. *Ann. Rev. Biochem.* 48 (1979): 136. © 1979 by Annual Reviews Inc.]

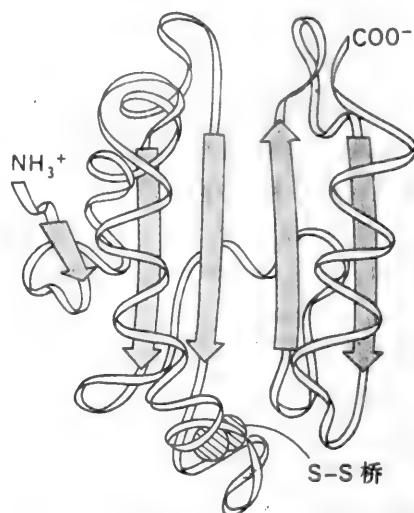


图22-19 大肠杆菌氧化的硫氧还蛋白主链构象的示意图。活泼的二硫桥用圆表示。[依据DP. Carl Ivar Bråden惠赠的图。]

化的谷胱甘肽(二硫化物形式)还原的反应。此外，还需要有**谷氧还蛋白**(glutaredoxin)把谷胱甘肽的还原能力转移给核苷酸还原酶(图22-20)。谷氧还蛋白是一种新的蛋白质。我们还不了解在正常细胞的核苷酸还原作用中，硫氧还蛋白体系和谷氧还蛋白体系各自相应的贡献。

变构相互作用精确地控制核苷酸二磷酸的还原。核苷酸还原酶的B1亚基含有两类变构部位：其中一个控制酶的总活力，而另一个调节底物专一性。dATP的结合是脱氧核苷酸大量存在的信号，它使核苷酸还原酶的总催化活力降低。与ATP结合可使上述的反馈抑制逆转。dATP或ATP与底物专一性控制部位结合可以加强UDP和CDP这类嘧啶核苷酸的还原。与dTTP结合可以促进GDP的还原，也可以抑制嘧啶核苷酸的进一步还原。随后dGTP的水平升

高，使ADP的还原受到刺激。虽然，核苷酸还原酶有多种构象状态，每一种状态具有不同的催化性质。这种复杂的调节方式提供四种脱氧核苷酸的恰当补给，以满足DNA合成的需要。

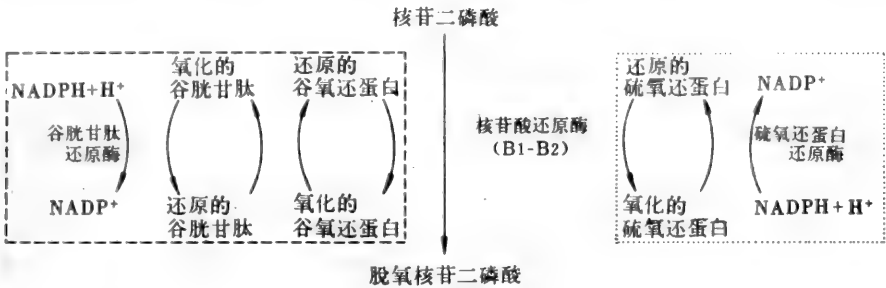


图22-20 核苷酸还原酶使核苷二磷酸还原成为脱氧核苷二磷酸。电子通过一系列的巯基从NADPH转移。硫氧还蛋白体系（用点线框示）和谷氧还蛋白体系（用虚线框示）可以充当还原能力的来源。

### 脱氧胸苷酸由脱氧尿苷酸经甲基化作用而形成

尿嘧啶并非DNA的组分。确切地说，DNA含有胸腺嘧啶，它是尿嘧啶的甲基化的类似物。这一步最后加工发生在脱氧核苷一磷酸的水平上：胸苷酸合成酶使脱氧尿苷酸（dUMP）甲基化成脱氧胸苷酸（dTMP）。这个反应里的甲基供体是四氢叶酸衍生物，而不是S-腺苷甲硫氨酸。明确地说，甲基碳来自N<sup>5</sup>，N<sup>10</sup>-亚甲基四氢叶酸。请注意，插入到脱氧尿苷酸中去的甲基比这个四氢叶酸衍生物中的亚甲基更为还原。这个还原作用的电子来源是什么？这两个电子以氢化物离子（H<sup>-</sup>）的形式来自四氢叶酸部分，并且是从该酸环上移来的。这个氢成为dTMP的甲基的一部分。在这个反应里，四氢叶酸被氧化成二氢叶酸。因此，N<sup>5</sup>，N<sup>10</sup>-亚甲基四氢叶酸在甲基化反应里既充当电子供体，又充当一碳供体（图22-21）。

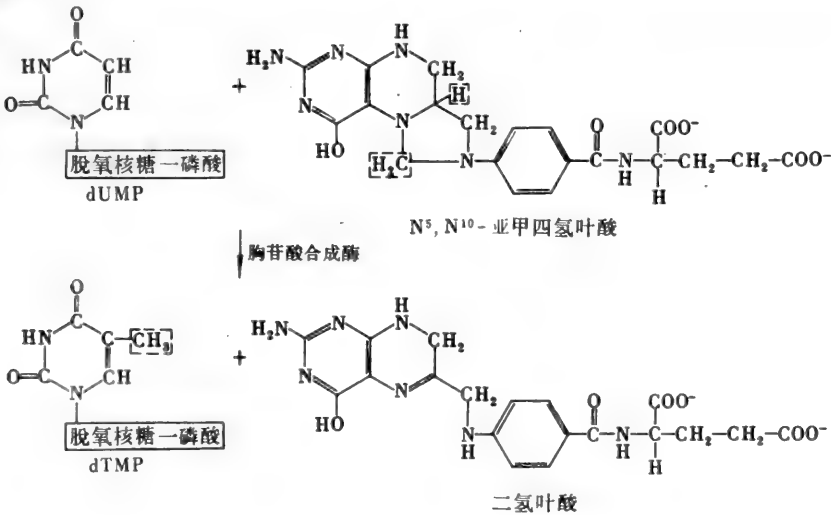
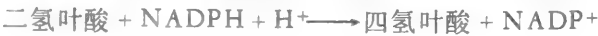


图22 21 从dUMP合成dTMP。

请回忆，一碳转移发生在四氢叶酸的水平上，而不是在二氢叶酸的水平上。因此，四氢叶酸必须再生。这由二氢叶酸还原酶来完成，它利用NADPH作还原剂。



### 几种抗癌药物封闭脱氧胸苷酸的合成

迅速分裂的细胞需要有充分的脱氧胸苷酸的供应，以用于合成DNA。抑制dTMP合成可使这些细胞受到损伤，这一点已在癌症的化疗中予以利用（图22-22）。胸苷酸合成酶和二氢叶酸还原酶是值得选用的靶酶。氟尿嘧啶（或氟脱氧尿苷）是临床上很有用的抗癌药物，它在体内转变成氟脱氧尿苷酸（F-dUMP）。这个dUMP的类似物先作为正常底物起作用，通过部分催化循环，然后不可逆地抑制胸苷酸合成酶。

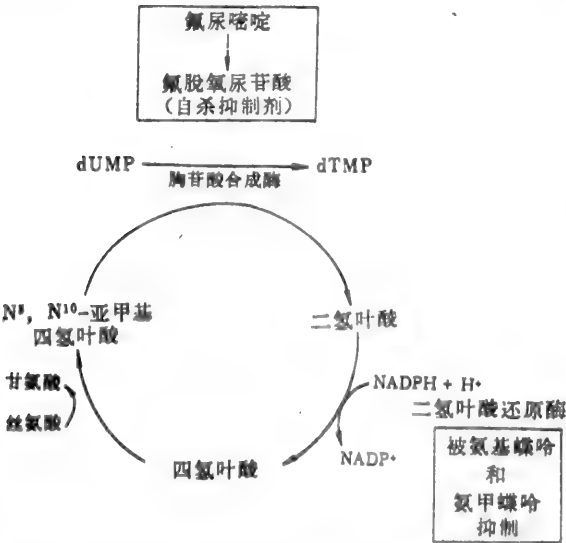


图22-22 胸苷酸合成酶和二氢叶酸还原酶在癌症化疗方面是靶酶。氟脱氧尿苷酸抑制dUMP的甲基化。叶酸类似物如氨基蝶呤和氨甲蝶呤阻断四氢叶酸的再生。

首先，酶的一个巯基加到结合的F-dUMP的C-6上。然后亚甲基四氢叶酸再加到这个中间产物的C-5上。就dUMP而言，一个氢化物离子随后移到叶酸的亚甲基上，而从结合的核苷酸的C-5上移去一个质子。但是，对F-dUMP来说，F+不能被酶除去，因此催化作用在共价复合物形成的阶段被阻断，共价复合物是由F-dUMP，亚甲基四氢叶酸和酶的巯基形成的（图22-23）。

通过抑制四氢叶酸的再生，也可以阻断dTMP的合成（图22-22）。二氢叶酸的类似物如氨基蝶呤和氨甲蝶呤是二氢叶酸还原酶的潜在的竞争性抑制剂( $K_i < 10^{-9}$  mol/L图22-24)。氨甲蝶呤在治疗急性白血病和绒毛膜癌方面是一种可贵的药物。

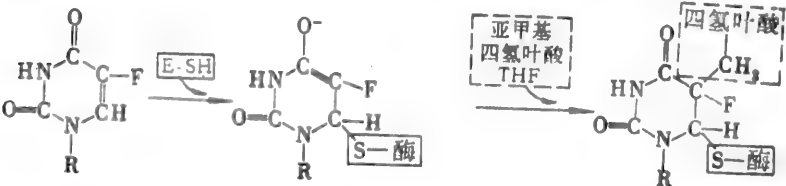


图22-23 氟脱氧尿苷酸（F-dUMP）不可逆地抑制胸苷酸合成酶。这个类似物可与酶的巯基（用实线框示）和亚甲基四氢叶酸（用虚线框示）二者形成共价的复合物。

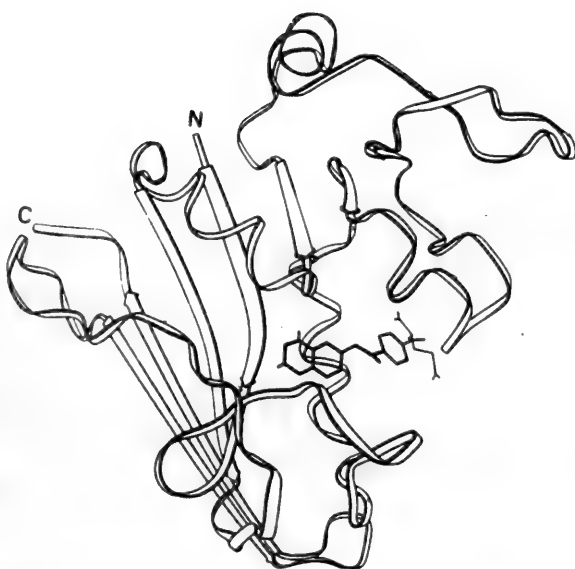
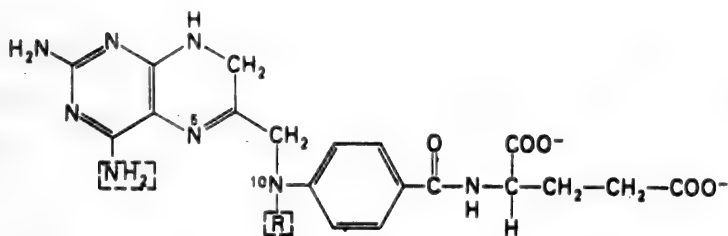


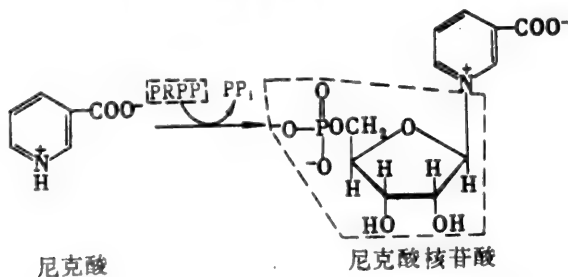
图22-24 大肠杆菌二氢叶酸还原酶的三维结构，带一个结合的氨甲蝶呤。[承 Dr. Joseph Kraut 特许。]



氨蝶呤 ( $R = H$ ) 和氨甲蝶呤  
( $R = CH_3$ ) 的结构

ATP是  $NAD^+$ 、FAD和 辅酶A 的前体

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 ( $NAD^+$ ) 的生物合成以尼克酸和 PRPP 形成尼克酸核苷酸为起点。尼克酸是从色氨酸演变而来的。人的饮食中如有足量的色氨酸供应，人就可以合成必要数量的尼克酸。但是，如果饮食中的色氨酸摄入量很低，就需要有外源性的色氨酸供应。糙皮病是一种营养缺乏症，起因是由于饮食中色氨酸和尼克酸的供应量不足。



AMP部分从ATP转移到尼克酸核苷酸，形成脱酰胺-NAD<sup>+</sup>。最后一步是谷酰胺的酰胺基转移到尼克酸的羧基上，形成NAD<sup>+</sup>（图22-25）。NAD<sup>+</sup>的腺嘌呤核糖部分的2'-羟基经磷酸化演变成NADP<sup>+</sup>。这个磷酸基转移反应是由NAD<sup>+</sup>激酶催化的。

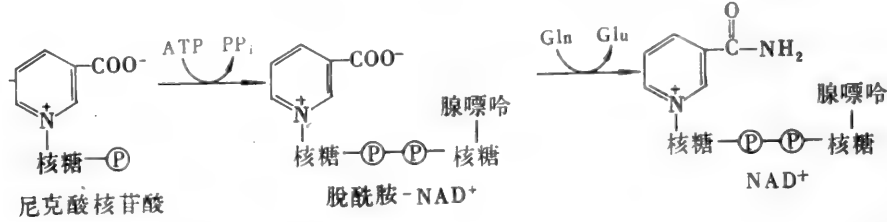


图22-25 从尼克酸核苷酸合成NAD<sup>+</sup>。

黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）是从核黄素和两个ATP分子合成的。ATP使核黄素磷酸化，产生核黄素5'-磷酸（又称黄素单核苷酸）。然后再从另一个ATP分子转移一个AMP部分给核黄素5'-磷酸，形成FAD。

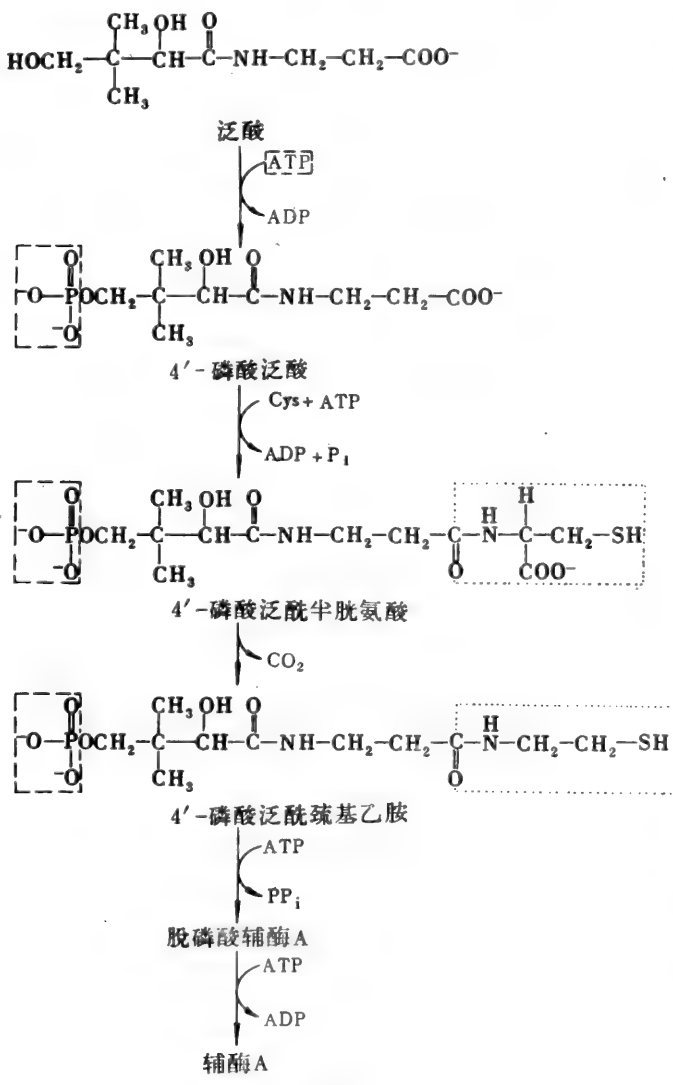


图22-26 从泛酸合成辅酶A

化，产生核黄素5'-磷酸（又称黄素单核苷酸）。然后再从另一个ATP分子转移一个AMP部分给核黄素5'-磷酸，形成FAD。

核黄素 + ATP → 核黄素5'-磷酸 + ADP  
核黄素5'-磷酸 + ATP ⇌ 黄素腺嘌呤二核苷酸 + PP<sub>i</sub>

在动物中，辅酶A（CoA）合成从泛酸的磷酸化开始（图22-26）。动物在饮食内需要泛酸，但是植物和微生物可以合成泛酸。在4'-磷酸泛酸的羧基和半胱氨酸的氨基之间形成一个肽键。半胱氨酸部分失去羧基，结果形成4'-磷酸泛酰巯基乙胺。然后ATP的AMP部分转移给这个中间产物，形成脱磷酸辅酶A。最后，它的3'-羟基磷酸化，产生辅酶A。

NAD<sup>+</sup>，FAD和CoA的生物合成有一个共同的特点，即ATP的AMP部分转移给一个磷酸化的中间产物的磷酸基团。在这个反应里形成的焦磷酸水解为正磷酸。

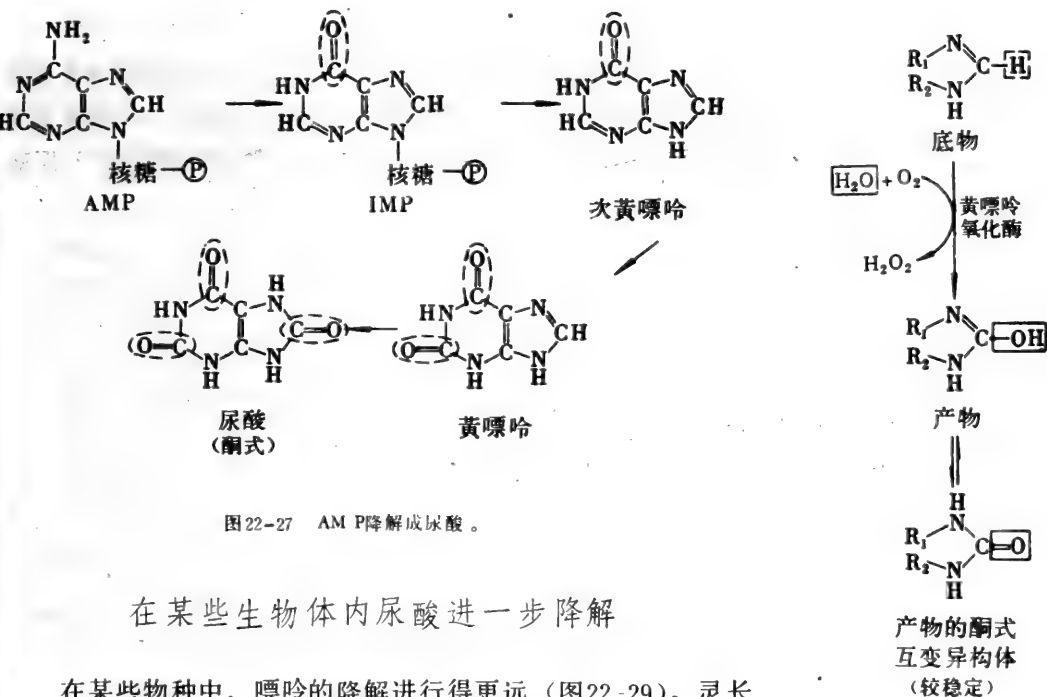


在生物化学里，这是一个重复出现的图案：生物合成反应常常是由释放的焦磷酸水解所驱动的。

### 在人体内嘌呤降解成尿酸

细胞内的核苷酸经历着连续不断的转换更新。核苷酸酶使核苷酸水解，降解为核苷。核苷磷酸化酶催化核苷的磷酸解作用，产生自由的碱基和核糖1-磷酸（或脱氧核糖1-磷酸）。磷酸核糖变位酶使核糖1-磷酸异构化，成为核糖5-磷酸，它是PRPP合成中的底物。有些碱基在补救途径中重新利用，形成核苷酸。

AMP降解的途径（图22-27）还包含一个额外的步骤，腺苷酸脱氨酶使AMP脱氨，形成IMP。随后的反应产生自由碱基次黄嘌呤，它们都遵循一般的规律。黄嘌呤氧化酶是含钼和铁的黄素蛋白，它使次黄嘌呤氧化，成黄嘌呤，然后再成尿酸（图22-28）。这两个反应中的氧化剂都是氧分子，它被还原成 $H_2O_2$ ，然后 $H_2O_2$ 再被过氧化氢酶分解为 $H_2O$ 和 $O_2$ 。在从鸟嘌呤形成尿酸的过程中，黄嘌呤也是中间产物。在人体内，尿酸是嘌呤降解的最终产物，并随尿排出体外。



### 在某些生物体内尿酸进一步降解

在某些物种中，嘌呤的降解进行得更远（图22-29）。灵长类以外的哺乳动物都分泌尿囊素，它是由尿酸氧化形成的。硬骨鱼分泌尿囊酸，它是由尿囊素经水合作用形成的。在两栖类和多数鱼类中，降解作用还再向前进行一步。尿囊酸水解成两分子尿素和一分子乙醛酸。最后，有些海洋无脊椎动物将尿素水解成 $NH_4^+$ 和 $CO_2$ 。看来很可能是灵长类在进化过程中，逐步地丧失了催化这些反应的酶。

图22-28 黄嘌呤氧化酶催化的氧化反应。

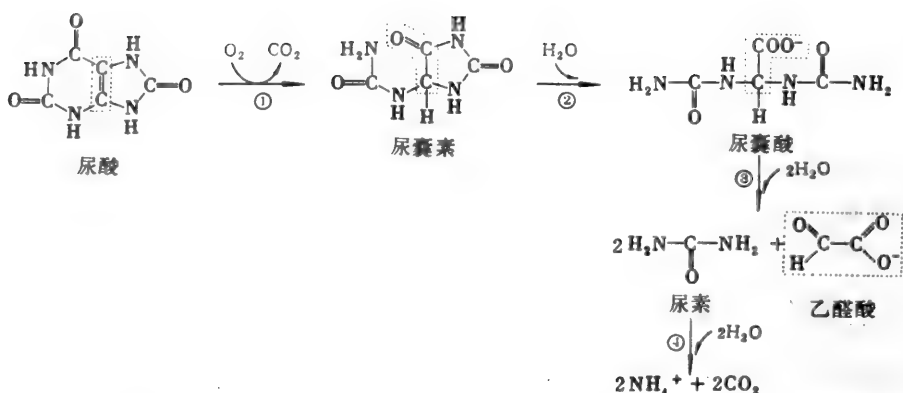
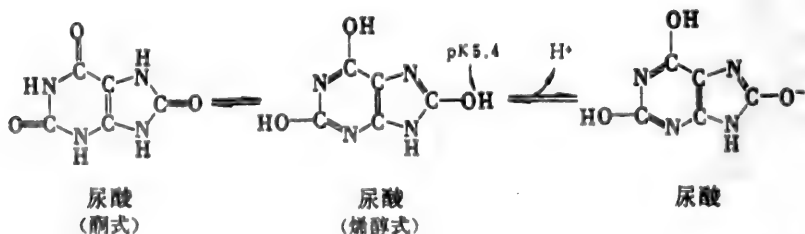


图22-29 尿酸降解成  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{CO}_2$ 。催化这些反应的酶有(1)尿酸酶，(2)尿酸素酶，(3)尿酸酶和(4)脲酶。

鸟类和陆生爬虫分泌尿酸而不分泌尿素，以便保存水

对陆生爬虫和鸟类来说，尿素不是氨基氮代谢的最终产物。这些动物从它们的过量氨基合成嘌呤，然后再把这些嘌呤降解为尿酸。这条排除氨基氮的曲折途径满足一个极其重要的功能：保存水。尿酸是排除氨基氮的运输工具，因为它在酸性pH条件下溶解度极低。尿酸中最酸的基团的  $\text{pK}_a$  是5.4。



鸟和陆生爬虫的酸性尿由膏状的尿酸晶体组成。伴随这些晶体只排出极少量的水。与此相反，若排出相当数量的溶解度极高的尿素时，必将伴有大量的水流出。

## 嘧啶的降解

胸腺嘧啶的降解(图22-30)可以作为例证，来说明嘧啶的降解。胸腺嘧啶降解成 $\beta$ -氨基异丁酸，它像一个氨基酸那样参加代谢。转氨作用把氨基除去，产生甲基丙二酸半醛，后者再转变成甲基丙二酸单酰CoA。甲基丙二酸单酰CoA转变成琥珀酰CoA，这是进入柠檬酸循环的起点，以前已曾讨论过(320页)。

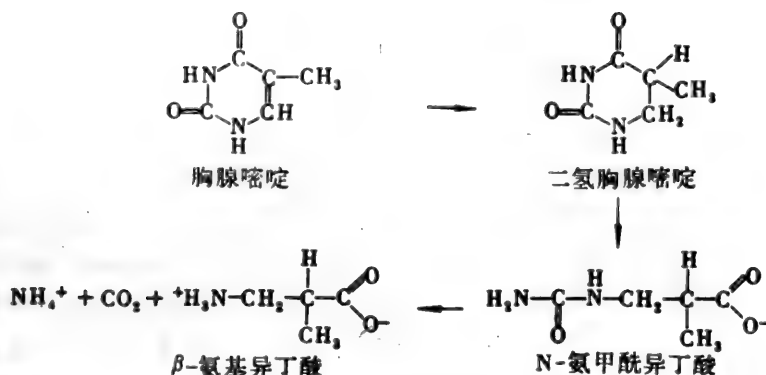


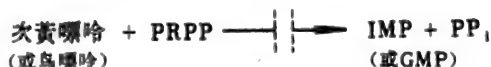
图 22-30 胸腺嘧啶的降解。

## 尿酸形成过多是痛风的起因

痛风是一种影响关节并且导致关节炎的疾病。它的主要生物化学特征是血清中尿酸的水平升高。尿酸钠晶体的沉淀触发关节的炎症。由于尿酸晶体在肾中沉积也可能发生肾脏疾病。痛风主要是影响成年男性。一位杰出的十七世纪的英国医生西德纳姆，T. (Thomas Sydenham) 曾对痛风的急性发作写了一段生动的描述，他本人也曾患这种病：

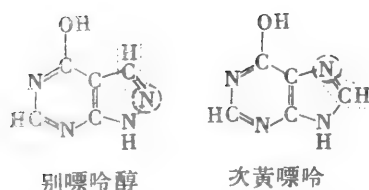
患者上床入睡时健康状况良好。清晨二时左右，他因大脚趾剧痛而早醒；较少见的是脚后跟、踝或脚背剧痛。这种痛苦简直好像关节脱位一样，但是患部的感觉又像浇了冷水。随之而来的是寒战和哆嗦，还有一点发烧。开始本来不算太厉害的疼痛这时变得更为严重。随着这种痛苦程度的增加，寒战和哆嗦也加重。过了一段时间之后，这种现象达到高峰，患部涉及跗骨和跖骨及其韧带。忽而是韧带剧烈拉伸和撕裂——或而是一阵剧痛，现在又是一种重压和绷紧感。这时患部的感觉如此敏锐和强烈，它甚至经受不住被子的重量，也受不住一个人在屋里走动时所引起的刺耳声。整个夜晚都在痛苦、失眠、患部转动和在不断地改变姿势中度过；辗转翻身和关节疼痛同样地持续不断，而到恶性发作的时候，更加的严重。

多数痛风病例的生物化学损伤尚未阐明。看来可能痛风是多种先天性代谢疾病的表现，其中常见的现象是形成过量的尿酸。有些患者中的次黄嘌呤、鸟嘌呤磷酸核糖转移酶具有部分缺陷，这种酶催化IMP和GMP的补救合成。

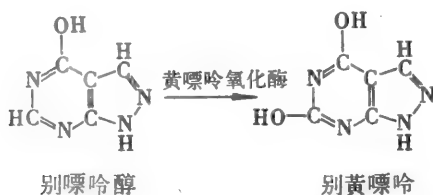


这种酶有缺陷使GMP和IMP通过补救途径合成的作用降低，而PRPP的水平升高。从头合成途径的嘌呤生物合成明显加快。少数痛风患者的磷酸核糖焦磷酸合成酶水平异常地高。这种酶的变构控制在这些患者体内受到损害。结果使PRPP过量地形成，由此更进一步加快了嘌呤从头合成的速度。

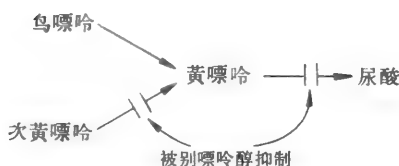
别嘌呤醇是次黄嘌呤的类似物，其中N 7和C 8的位置互换，它可用来医治痛风症。别嘌呤



嘌呤的作用机制非常有趣：它首先是作为黄嘌呤氧化酶的底物起作用，然后又是作为黄嘌呤氧化酶的抑制剂起作用。这种酶使别嘌呤醇羟基化成别黄嘌呤，后者保持与活力部位紧密结合。由于别黄嘌呤的结合，黄嘌呤氧化酶的钼原子保持在 + 4 价氧化状态，而不像在一次正常的催化循环中那样，回复到 + 6 价氧化状态。别嘌呤醇的这种作用方式是自杀抑制作用的一个实例，其中酶把一个化合物转变为强的抑制剂，而这个抑制剂又立即使该酶失活。



服用别嘌呤醇以后不久，从次黄嘌呤和黄嘌呤合成尿酸的量很快降低了。



服用别嘌呤醇后，血清中次黄嘌呤和黄嘌呤的浓度升高，而尿酸的浓度降低。别嘌呤醇实际上可以使尿酸石的形成停止，而且对关节炎也有改进。还有，嘌呤生物合成的总速度也有所降低。别嘌呤醇的这种抑制作用依赖于它与 PRPP 形成核苷酸的反应。结果，PRPP 的水平降低，而 PRPP 是嘌呤从头合成中的限制性底物。此外，别嘌呤醇核苷酸抑制酰胺磷酸核糖转移酶将 PRPP 转变为磷酸核糖胺。

### 莱-纳二氏 (Lesch-Nyhan) 综合症：自残、智力 迟钝和形成过量的尿酸

几乎完全没有次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶会带来破坏性的后果。这种先天性的代谢紊乱称为莱-纳二氏 (Lesch-Nyhan) 综合症，它最突出的表现是强制性的自残行为。在二岁或三岁时，患儿开始咬自己的手指和嘴唇。自残的癖好如此强烈，以致必须采取诸如用

纱布包手的措施来保护这些患者。这些受害者也会有彼此寻衅的倾向。智力缺陷和痉挛是莱-纳二氏综合症的又一类特征。血清中尿酸水平升高引起患者早年形成石头, 日后再继之以痛风的症状。这种疾病按伴性的隐性性状而遗传。

如果次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶实际上不存在, 其生物化学后果是产生过量的尿酸和 PRPP 浓度升高。此外, 通过从头合成途径的嘌呤生物合成速度也有显著提高。转移酶不存在和这些奇怪的神经性症候的关系仍然是一个谜。大脑在 IMP 和 GMP 合成方面可能非常依赖于补救途径。次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的正常水平在大脑中比任何其它组织中都高。与此相反, 催化重新合成途径中关键步骤的酰胺转移酶在大脑里的活力都相当低。别嘌呤醇在降低莱-纳二氏综合症的尿酸合成方面是有效的。但是, 它对嘌呤重新合成的速度没有影响, 而且也不能使这种病的神经性临床表现缓解。莱-纳二氏综合症患者不能把别嘌呤醇转变为核苷酸, 因为他们缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶。所以, 施用别嘌呤醇不能降低这些人的 PRPP 水平, 因而嘌呤的重新合成也并不减少。

莱-纳二氏综合症表明, IMP 和 GMP 合成的补救途径不是无缘无故的。显然补救途径是起着一种关键性的作用, 而这种作用尚未为人们所充分认识。此外, 嘌呤的从头合成途径和补救合成途径的相互作用仍然有待阐明。再者, 莱-纳二氏综合症揭示, 异常行为如自残和极度的敌对行动可以由仅仅缺少一种酶而引起。这个发现对精神病学的今后发展有重要的意义。

## 概 要

嘌呤环是由多种前体组装而成的, 这些前体是: 谷酰胺、甘氨酸、天冬氨酸、次甲四氢叶酸、 $N^{10}$ -甲酰四氢叶酸和  $CO_2$ 。嘌呤核苷酸从头合成的关键步骤是从 PRPP 和谷酰胺合成 5-磷酸核糖胺。嘌呤环在组装的过程中与核糖磷酸相连接。甘氨酸的加成, 继之以甲酰化、氨化、和闭环, 产生 5-氨基咪唑核苷酸。这个中间产物含有嘌呤骨架完整的五员环。加入  $CO_2$  和天冬氨酸的氮原子及甲酰基, 然后再闭环, 产生次黄苷酸 (IMP), 它是一种嘌呤核苷酸。AMP 和 GMP 都是从 IMP 形成的。嘌呤核苷酸也可以通过补救途径合成, 其中一个事先形成的碱基直接与 PRPP 反应。5-磷酸核糖-1-焦磷酸合成酶和谷酰胺-PRPP 酰胺转移酶受嘌呤核苷酸的反馈抑制, 这在调节它们的生物合成方面很重要。

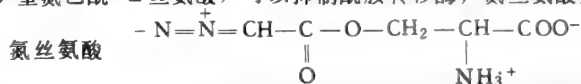
嘧啶环先组装, 然后再与核糖磷酸连结, 形成嘧啶核苷酸, 这与嘌呤核苷酸从头合成的反应顺序相反。PRPP 又是核糖磷酸部分的供体。从氨甲酰磷酸和天冬氨酸形成氨甲酰天冬氨酸是嘧啶环合成的开始, 这个反应由天冬氨酸转氨甲酰酶催化。脱水、环化和氧化作用产生乳清酸, 后者与 PRPP 反应, 产生乳清酸核苷酸。这个嘧啶核苷酸经脱羧作用产生 UMP。然后 UTP 经氨化作用形成 CTP。大肠杆菌嘧啶生物合成由天冬氨酸转氨甲酰酶的反馈抑制来调节, 这种酶催化关键步骤。CTP 抑制这种酶, 而 ATP 激发这种酶。天冬氨酸转氨甲酰酶由可以分开的调节亚基和催化亚基组成。在哺乳类细胞里, 一条多肽链含有嘧啶生物合成的前三种酶。

脱氧核苷酸是 DNA 的前体, 由核苷二磷酸还原而成。这些转变由核苷酸还原酶催化。硫氧还蛋白或谷氧还蛋白把电子从 NADPH 转给位于核苷酸还原酶催化部位的巯基。dUMP 通过甲基化作用形成 dTMP。这个反应里的一碳供体和电子供体是  $N^5, N^{10}$ -亚甲基四氢叶

酸，它转变成二氢叶酸。然后四氢叶酸再由二氢叶酸还原而再生。二氢叶酸还原酶催化这个反应，并受叶酸类似物如氨基蝶呤和氨甲蝶呤抑制。这些化合物被用做抗肿瘤药物。

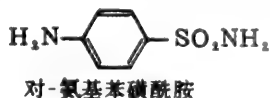
## 习 题

1. 请写出平衡的方程式，表明通过戊糖磷酸途径的氧化支路从葡萄糖合成PRPP。
2. 请写出平衡的方程式，表明从谷酰胺、 $\text{CO}_2$ 和天冬氨酸合成乳清酸。
3. 请写出在下列化合物的生物合成中，活化反应物的名称：
  - (a) 磷酸核糖胺
  - (b) 氨甲酰天冬氨酸
  - (c) 乳清酸核苷酸（从乳清酸合成）
  - (d) 尼克酸核苷酸
  - (e) 磷酸核糖邻氨基苯甲酸
4. 抗生素氯丝氨酸（邻-重氮乙酰-L-丝氨酸）可以抑制酰胺转移酶，氯丝氨酸是谷酰胺的类似物。



在经氯丝氨酸处理过的细胞里，有哪些嘌呤生物合成的中间产物会积累起来？

5. 从dUMP合成dTMP是与丝氨酸转变为甘氨酸相偶联的，请写出平衡的方程式来表明这个过程。
6. 细菌生长可被对-氨基苯磺酰胺及有关的磺胺药物抑制，同时有5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸积累。加入对-氨基苯甲酸可以使这种抑制作用逆转。



请提出对-氨基苯磺酰胺的抑制效果的作用机制。

7. 利用PRPP的主要生物合成反应都有哪些？
8. 大肠杆菌氨甲酰磷酸合成酶由一个小亚基（40 kdal）和一个大亚基（130 kdal）构成。分离的小亚基有谷酰胺酶活力，而分离的大亚基可以从 $\text{NH}_3$ 合成氨甲酰磷酸，但不能从各酰胺合成氨甲酰磷酸。此外，在碳酸氢盐的存在下分离的小亚基是ATP酶。请根据这些分开的亚基的活力，为完整的酶提出合理的反应机制。

另外的习题，请参见W.B. Wood, J.H. Wilson, R.M. Benbow和L.E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 15.

## 第23章 代谢的整合

怎样协调代谢反应的复杂网络，来满足整个有机体的需要？本章陈述哺乳类动物代谢整合的某些内在规律。首先扼要重述代谢的方针及其调节的重复出现的基本图案。然后按分子在三个关键性十字路口（葡糖6-磷酸，丙酮酸和乙酰CoA）的流动来描述不同途径间的相互作用。继这个主要枢纽站的考察之后，讨论大脑、肌肉、脂肪组织和肝的代谢情况方面的差别（图23-1）。其次考虑燃料代谢的主要激素调节——胰岛素，胰高血糖素，肾上腺素和去甲肾上腺素。然后我们再转向讨论代谢整合的最重要的方面——血液中葡萄糖水平的控制。本章的最后部分论述在长期饥饿情况下非凡的代谢适应性。

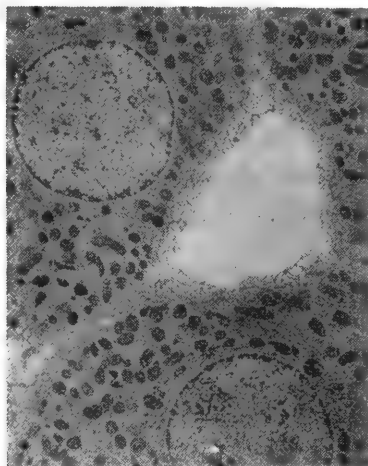


图23-1 肝细胞的电镜照片。肝在代谢整合中起关键作用。[蒙Dr. Ann Hubbard特许。]

### 代谢的战略：扼要重述

在第11章里已经讨论过，代谢的基本战略是形成ATP、还原能力及生物合成用的构造单元。让我们简略地回顾一下这些中心主题：

1. **ATP是普遍通用的能量货币** ATP的磷酸基转移势高，这使它可以在肌肉收缩、主动运输、信号放大和生物合成中充当能源。一个ATP分子水解可以使偶联反应里产物与反应物的平衡比值改变约 $10^8$ 倍。因此，一个在热力学上不利的反应顺序如果与足够数量的ATP分子的水解作用相偶联，就可以变成高度有利。例如，在甲羟戊酸转变为异戊烯焦磷酸时，就有三个ATP分子被消耗。异戊烯焦磷酸是胆固醇合成中活化的五碳单位。

2. **ATP是由燃料分子如葡萄糖、脂肪酸和氨基酸经氧化作用而产生的** 在多数这些氧化作用中，共同的中间产物是乙酰CoA。柠檬酸循环将乙酰单位完全地氧化成 $\text{CO}_2$ ，同时形成NADH和 $\text{FADH}_2$ 。然后这些电子载体再将它们的高电势电子转移给呼吸链。随后电子流向 $\text{O}_2$ ，推动质子穿过线粒体内膜。这个质子梯度再用于合成ATP。糖酵解是另一个产生ATP的过程，但是它比氧化磷酸化所形成ATP的数量少得多。葡萄糖氧化成丙酮酸只产生两个ATP分子，而当葡萄糖完全氧化至 $\text{CO}_2$ 时，有三十六个ATP分子形成。但是，糖酵解可以在厌氧条件下迅速进行一短时间；与此相反，氧化磷酸化需要连续不断地供给 $\text{O}_2$ 。

3. **在还原性生物合成中，NADPH是主要的电子供体** 在多数的生物合成中，产物都比前体更还原，因此除需要ATP以外，还需要有还原能力存在。驱动这些反应所需要的高电

势电子通常由NADPH提供。例如，在脂肪酸生物合成中，加入的二碳单位的酮基被还原成亚甲基，这是由两分子NADPH输入四个电子实现的。在羟基化反应中， $O_2$ 被双功能加氧酶活化，这也可以说明NADPH作为还原剂的普遍作用。戊糖磷酸途径提供大部分必要的NADPH。在脂肪酸合成中，当乙酰 CoA 从线粒体转移到胞液时，苹果酸酶也可以大量形成NADPH这个电子载体。

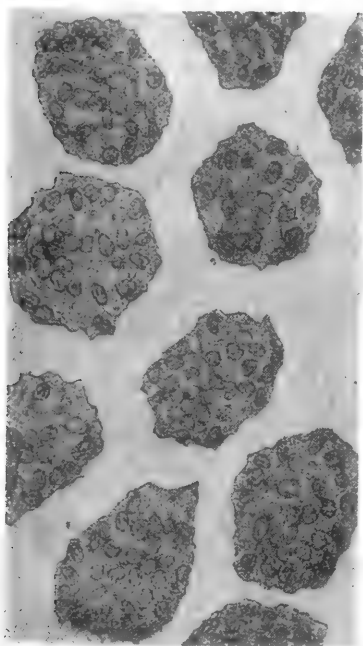


图 23-2 电镜照片表示视杆细胞内部有许多线粒体：这些光受体细胞产生大量ATP，并且十分依赖于连续地供 $O_2$ 。[蒙Dr.Michael Hogan特许。]

4. 生物分子是从比较小的一套构造单元构成的形形色色的生命分子是从数量少得多的前体合成的。产生ATP和NADPH的代谢途径也为更复杂分子的生物合成提供构造单元。例如，糖酵解形成的二羟丙酮磷酸产生磷脂酰胆碱和其它磷酸甘油酯的甘油骨架。磷酸烯醇式丙酮酸是糖酵解的另一个中间产物，它提供芳香氨基酸的部分碳骨架。乙酰 CoA 是多数燃料降解的共同中间产物，它在多种生物合成中提供一个二碳单位。在柠檬酸循环中形成的琥珀酰 CoA 是卟啉的前体之一。戊糖磷酸途径除形成NADPH外，还形成核糖5-磷酸，它是核苷酸的糖单位的来源。许多生物合成也需要一碳单位。四氢叶酸是这些单位在若干氧化水平上的来源。这些衍生物及S-腺苷甲硫氨酸的形成都与氨基酸代谢紧密结合，S-腺苷甲硫氨酸是主要的甲基供体。因此，中心的代谢途径既有合成代

谢的作用，也有分解代谢的作用。

5. 生物合成的途径和降解的途径几乎总是不同的。例如，脂肪酸合成的途径与其降解的途径不同。同样地，糖原合成和降解也是通过各不相同的两套反应。这样的区别使生物合成途径和降解途径在热力学上随时都是有利的。一条生物合成的途径与足够数量的ATP分子的水解相偶联，就会变成放能反应。例如，在葡糖异生作用中，把丙酮酸转变为葡萄糖时，容易消耗 $\sim P$ ，而消耗 $\sim P$ 的数量比在糖酵解中，将葡萄糖转变为丙酮酸时所获得的多四个。这四个额外的 $\sim P$ 将保证葡糖异生和糖酵解一样，在一切细胞条件下，都是高度放能的反应。最本质的要点是，代谢途径的速度受关键酶的活力所控制，而不是由质量作用控制。生物合成途径与降解途径区分，对有效的代谢控制贡献很大。

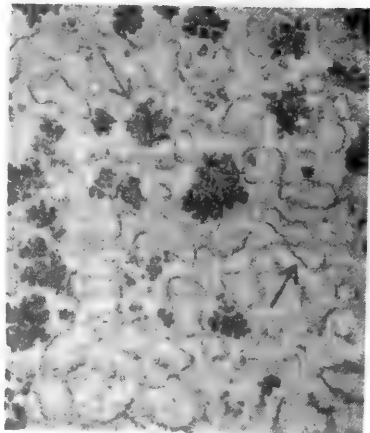


图 23-3 部分肝细胞的电镜照片。上面的箭头指向糖原颗粒，下面的箭头指向光滑的内质网。双功能加氧酶所催化的羟基化反应在光滑内质网中进行。[蒙Dr.Gorge Palade特许。]



## 代谢调节中重复出现的基本图案

细胞内各种反应的复杂网络是精确调节和协调的。代谢通过以下几种方式来控制:

1. **变构相互作用** 在多数代谢途径中,分子的流动主要决定于某些酶的数量和活力,而不是主要决定于有可供利用的底物。基本上不可逆反应是可能的控制部位。途径中的第一个不可逆反应(即关键步骤)通常是重要的控制要素。催化关键步骤的酶是变构调节的,糖酵解中的磷酸果糖激酶和脂肪酸合成中的乙酰 Co A 羧化酶就是例证。途径中随后的不可逆反应也是可以控制的。变构相互作用使这些酶能够察觉形形色色的信号,并且整合这种信息。

2. **共价修饰** 有些调节酶除受变构相互作用的控制外,还为共价修饰所控制(图23-4)。例如,磷酸化作用使糖原磷酸化酶的催化活力加强,而使糖原合成酶的催化活力降低。这些共价修饰是由专一的酶所催化的。另一个例子是谷酰胺合成酶,它通过共价地插入一个AMP单位而变得活力降低。这个修饰基团的加入或除去也是由专一性酶所催化的。为什么在非共价的变构控制之外,还要使用共价修饰的方式呢?代谢作用中关键酶的共价修饰是放大级联的最终阶段。因此,代谢途径可以由非常小的触发信号所启动或关闭,例如肾上腺素在刺激糖原分解方面的作用可以表明这一点。

3. **酶的水平** 酶的数量及其活力也是受控制的。有些调节酶的合成速度和降解速度受激素因子的控制。

4. **区域化** 区域的存在显著地影响真核细胞的代谢情况。糖

酵解、戊糖磷酸途径和脂肪酸合成在胞液中进行;而脂肪酸氧化,柠檬酸循环和氧化磷酸化

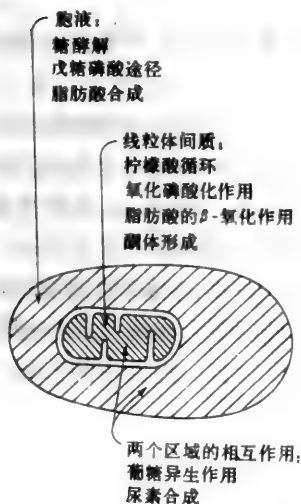


图23-5 主要代谢途径的区域化。

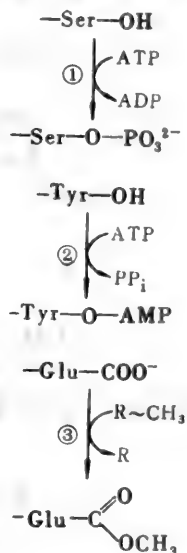


图23-4 蛋白质可逆共价修饰  
举例: (1) 磷酸化作用,  
(2) 腺苷酰化作用,  
和 (3) 甲基化作用。

在线粒体内实现。有些过程如葡糖异生和尿素合成则依赖于在两个区域中都发生的反应的相互作用。有些分子的命运决定于它们是在胞液内,还是在线粒体内,因此它们流过线粒体内膜常是受调节的。例如,运入线粒体的脂肪酸迅速降解;与此相反,胞液内的脂肪酸则被酯化或运出。请回忆,长链脂肪酸是以肉碱酯的形式运入线粒体间质的,肉碱是一个载体,它使这些分子能够穿过线粒体内膜。

5. **器官的代谢特性** 具不同代谢功能的器官的存在,使高等真核生物中的调节作用受到深刻的影响和加强。下面很快即将讨论这些相互作用。

## 主要的代谢途径和控制部位

让我们回顾一下主要代谢途径的作用，及其控制的主要部位：

1. **糖酵解** 胞液内的这一系列的反应把葡萄糖转变为两个丙酮酸分子，同时产生两个ATP和两个NADH。为了使糖酵解能继续进行，在甘油醛3-磷酸脱氢酶所催化的反应内消耗的  $\text{NAD}^+$  必须再生。在厌氧条件下，正如在高度活动的骨骼肌中的情况一样，这个反应是通过丙酮酸还原为乳酸来完成的。或者通过另一种方式，如在有氧条件下，电子运输链把电子从NADH转移到 $\text{O}_2$ ，从而使 $\text{NAD}^+$ 获得再生。糖酵解服务于两个主要目的：它把葡萄糖降解，以产生ATP；并且为生物合成提供碳骨架。调节葡萄糖转变为丙酮酸的速度，就可以满足这种双重的需要。

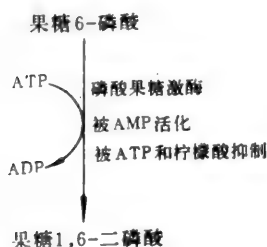


图23-6 在糖酵解的调节中，磷酸果糖激酶是关键酶。

磷酸果糖激酶催化糖酵解的关键步骤，它是最重要的控制部位。高水平的ATP抑制磷酸果糖激酶。这个抑制效应可为柠檬酸所加强，而被AMP逆

转。因此，糖酵解的速度依赖于对ATP的需要，以ATP/AMP比值为其信号，也依赖于对构造单元的需要，以柠檬酸的水平为其信号。

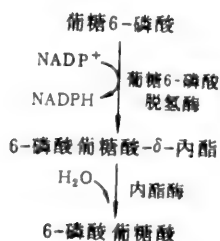


图23-7 葡萄糖6-磷酸的脱氢作用是戊糖磷酸途径中的关键步骤。

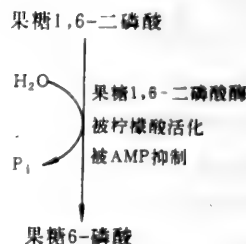


图23-8 果糖1,6-二磷酸酶是葡萄糖异生作用中的关键性控制部位。

转。因此，糖酵解的速度依赖于对ATP的需要，以ATP/AMP比值为其信号，也依赖于对构造单元的需要，以柠檬酸的水平为其信号。

2. **柠檬酸循环** 这是燃料分子——糖类，氨基酸和脂肪酸——的最终共同的氧化途径，它在线粒体内进行。多数燃料以乙酰CoA的形式进入循环。一个乙酰单位的完全氧化产生一个GTP，三个NADH和一个 $\text{FADH}_2$ 。然后四对电子通过电子运输链转移给 $\text{O}_2$ ，其结果是形成一个质子梯度，以驱动十一个ATP分子的合成。只当ADP同时被磷酸化成ATP时，NADH和 $\text{FADH}_2$ 才被氧化。这种紧密的偶联称为呼吸控制，它可保证柠檬酸循环的速度与对ATP的需要相匹配。充裕的ATP也使循环中三个酶的活力降低——柠檬酸合成酶，异柠檬酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶。柠檬酸循环也起合成代谢的作用。它为生物合成提供中间产物，如琥珀酰CoA，它是卟啉化合物部分碳骨架的来源。

巴斯德效应——呼吸作用对糖酵解的抑制，路易·巴斯德在研究酵母发酵时发现了这个现象。

在有氧条件下，糖类的消耗量比在厌氧条件下低约七倍。柠檬酸和ATP对磷酸果糖激酶的抑制作用大体上可以说明巴斯德效应。

3. 戊糖磷酸途径 这一系列的反应在胞液中进行，它们有两个目的：为还原性生物合成产生NADPH，和为核苷酸合成形成核糖5-磷酸。葡糖6-磷酸转变为核糖5-磷酸时产生两个NADPH。在这个途径中，葡糖6-磷酸脱氢是关键步骤(图23-7)。这个反应由NADP<sup>+</sup>的水平控制，NADP<sup>+</sup>是电子受体。NADPH中额外的磷酸基是一个标签，使它区别于NADH。这种区分使高NADPH/NADP<sup>+</sup>比和高NAD<sup>+</sup>/NADH比同时存在于同一区域内成为可能。结果，还原性生物合成和糖酵解作用就可以同时以高速度进行。

4. 葡糖异生作用 肝和肾可以从非糖类的前体如乳酸、甘油和氨基酸合成葡萄糖。进入这个途径的主要起点是丙酮酸：在线粒体内，丙酮酸羧化成草酰乙酸。然后草酰乙酸在胞液里脱羧和磷酸化，形成磷酸烯醇式丙酮酸。葡糖异生的其它突出反应是两步水解，它们绕过糖酵解的不可逆反应。葡糖异生和糖酵解的调节常常是互相对立的，从而当一个途径静止时，另一个途径则高度活跃。举例来说，AMP抑制果糖1,6-二磷酸酶，柠檬酸活化果糖1,6-二磷酸酶，它是葡糖异生中的一个关键酶(图23-8)。但是AMP和柠檬酸分子对磷酸果糖激酶则起相反的效果，而磷酸果糖激酶是糖酵解的标兵。

5. 糖原的合成和降解 糖原是一种很容易动员起来的贮存燃料，它是有分枝的葡萄糖残基的多聚物。UDP-葡萄糖是糖原合成中的活化中间产物，它是从葡糖1-磷酸和UTP形成的，糖原合成酶催化葡萄糖从UDP-葡萄糖转移到一条正在延长的糖原链上末端羟基基<sup>\*</sup>。糖原降解是通过一条与此不同的途径。磷酸化酶催化正磷酸切断糖原，产生葡糖1-磷酸。糖原合成和降解由激素触发的放大级联反应所协调控制，以使在磷酸化酶活跃时，合成酶不活跃，并且反之亦然。这些酶由磷酸化作用和非共价的变构相互作用来调节(282页)。

6. 脂肪酸的合成和降解 脂肪酸在胞液内合成，是通过二碳单位加入到在酰基载体蛋白上的正在延长的链内。丙二酸单酰CoA是活化的中间产物，它是由乙酰CoA羧化形成的。柠檬酸把乙酰基从线粒体带到胞液。为了把加入的乙酰单位还原，需要NADPH，柠檬酸这个运转工具可以提供部分需要的NADPH，其余部分来自戊糖磷酸途径。柠檬酸刺激乙酰CoA羧化酶，这个酶催化关键步骤(图23-9)。当ATP和乙酰CoA很充裕时，柠檬酸的水平升高，这使脂肪酸合成的速度加快。脂肪酸降解在另一个不同的区域，通过另一条不同的途径进行。它们在线粒体间质内通过β-氧化作用降解为乙酰CoA。然后如果草酰乙酸供应充分的话，乙酰CoA就进入柠檬酸循环。或者另一条途径是乙酰CoA可以产生酮体。在β-氧化途径内形成的FADH<sub>2</sub>和NADH通过电子运输链把它们的电子转移给O<sub>2</sub>。至于柠檬酸循环，只有当NAD<sup>+</sup>和FAD可以再生时，β-氧化才能继续。因此，脂肪酸降解的速度也是与对ATP的需要相偶联的。

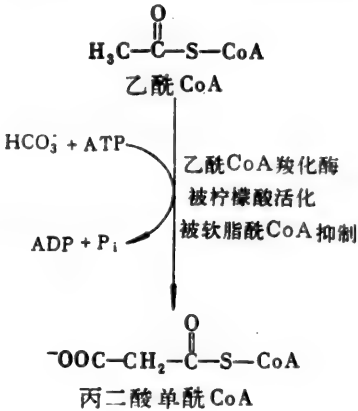


图23-9 乙酰CoA羧化酶是脂肪酸合成中的关键性控制部位。

<sup>\*</sup> 原文如此，疑为“末端残基的C-4羟基”之误——译者注。

## 关键性的交叉点：葡萄糖6-磷酸、丙酮酸和乙酰CoA

通过考查三个关键性的交叉路口：葡萄糖6-磷酸，丙酮酸和乙酰CoA，可以进一步了解在代谢作用中控制分子流动的因素。每一种交叉路口的分子都有几种大不相同的命运：

1. 葡萄糖6-磷酸 进入细胞的葡萄糖很快地磷酸化成葡萄糖6-磷酸，后者可以糖原的形式贮存，通过丙酮酸而降解，或转变为核糖5-磷酸（图23-10）。当葡萄糖6-磷酸和ATP充裕时，就形成糖原。与此相反，当生物合成需要ATP或碳骨架时，葡萄糖6-磷酸就流入糖酵解途径。因此，葡萄糖6-磷酸转变为丙酮酸可以是合成代谢性的，也可以是分解代谢性的。葡萄糖6-磷酸的第三条主要命运是流经戊糖磷酸途径，这为还原性的生物合成提供NADPH，也为核苷酸合成提供核糖5-磷酸。这两种产品的相关数量，可以通过这一系列高度灵活的反应，在一个很宽的范围内调节，前面已曾讨论过（258页）。葡萄糖6-磷酸可以通过动员糖原而形成，或者也可以通过葡萄糖异生的途径，从丙酮酸及其它非糖类前体而合成。下面不久即将讨论到，血液里葡萄糖水平低同时刺激肝和肾内的糖原分解作用和葡萄糖异生作用。肝和肾是与众不同的器官，它们具有葡萄糖6-磷酸酯酶，该酶可以使葡萄糖被释放入血液。

2. 丙酮酸 这个三碳的 $\alpha$ -酮酸是另一个主要的代谢交叉点（图23-11）。丙酮酸主要是从

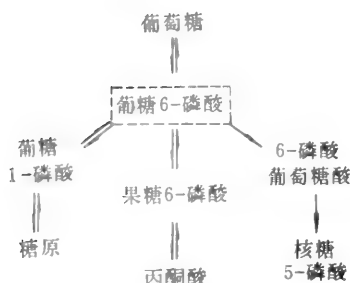


图23-10 葡萄糖6-磷酸的代谢命运。

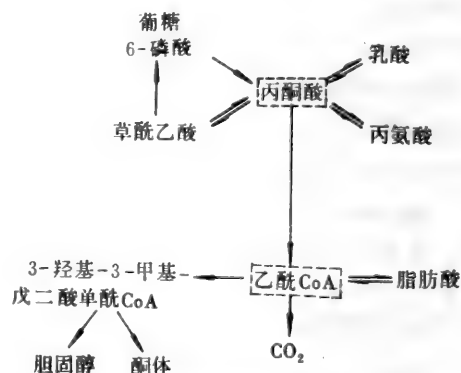


图23-11 丙酮酸和乙酰CoA的代谢命运。

葡萄糖6-磷酸，乳酸和丙氨酸演变来的。乳酸就是丙酮酸的还原形式。由乳酸脱氢酶催化的丙酮酸还原很容易实现，它可使NAD<sup>+</sup>再生，这保证了糖酵解可以在厌氧条件下短暂地进行。乳酸在诸如正在收缩的肌肉等活动的组织中形成，随后又被氧化回去成丙酮酸，这主要是在肝内进行。这种相互转变的本质是它争取了时间，并且把运动着的肌肉的代谢负担部分地转移给肝。胞液内另一个很容易逆转的反应是丙酮酸的转氨作用，丙酮酸是一个 $\alpha$ -酮酸，经转氨作用成相应的氨基酸丙氨酸。有几种氨基酸都可以按照这种方式进入中心代谢途径。与此相反，也可以通过这条路线从糖类前体合成好几种氨基酸。因此，转氨作用是氨基酸和糖类代谢之间的主要联系环节。丙酮酸的第三条命运是在线粒体内羧化成草酰乙酸。这个反应以及草酰乙酸随后转变为磷酸烯醇式丙酮酸的反应越过糖酵解的一个不可逆步骤，并从而使葡萄糖可以从丙酮酸合成。对于补充柠檬酸循环的中间产物来说，丙酮酸的羧化作用也很重要。当柠檬酸循环由于缺乏草酰乙酸这个中间产物而变得速度减慢时，乙酰CoA使丙酮酸羧化酶活化，并加强草酰乙酸的合成。而在另一方面，当柠檬酸循环由于ATP充裕而受抑制时，

从丙酮酸合成的草酰乙酸流入葡糖异生途径。丙酮酸的第四条主要命运是它经氧化脱羧作用而成乙酰 CoA。这个线粒体内的不可逆反应是代谢作用中的决定性反应：它规定糖类和氨基酸的碳原子经柠檬酸循环被氧化，或是用于脂类的合成。丙酮酸脱氢酶复合物催化这条不可逆的通道，经多重的变构相互作用和共价修饰严格地调节这个酶复合物的活力。只有当需要ATP时，或脂类合成需要二碳片段时，丙酮酸才迅速地转变成乙酰CoA。

3. 乙酰 CoA 这个活化的二碳单位的主要来源是丙酮酸的氧化脱羧和脂肪酸的  $\beta$  氧化（图23-11）。乙酰 CoA 也可以从生酮氨基酸演变而来。乙酰 CoA 的命运相当局限，这与代谢中的许多分子不同。乙酰单位可以被柠檬酸循环完全氧化为  $\text{CO}_2$ 。或者，三个乙酰 CoA 分子可通过其它途径形成3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA。这个六碳单位是胆固醇和酮体的前体。乙酰 CoA 的第三条主要命运是以柠檬酸的形式向外运输到胞液内，用于脂肪酸的合成。再次强调在哺乳类体内，乙酰 CoA 不能转变为丙酮酸，这是很重要的。因此，哺乳类也不能把脂类转变为糖类。

## 主要器官的代谢轮廓

脑、肌肉、脂肪组织和肝的代谢情况显著不同。让我们来考虑一下，这些器官在利用燃料来满足它们的能量需要方面，有什么差别：

1. 脑 葡萄糖实际上是人脑的唯一燃料，只是在长期饥饿的情况下才有例外。脑没有燃料贮存，因而需要有连续不断的葡萄糖供应，葡萄糖在一切时刻都可以自由地入脑。脑每天约消耗120克葡萄糖，这相当于输入能量约420kcal，占全身在静止状态下消耗葡萄糖量的60%。在饥饿时，酮体（乙酰乙酸及其还原的相应化合物3-羟基丁酸）代替葡萄糖充当脑的燃料。通过 CoA 从琥珀酰 CoA 转移使乙酰乙酸活化，产生乙酰乙酰 CoA（图23-12）。然后硫解酶使乙酰乙酰 CoA 断裂，产生两个乙酰 CoA 分子，后者进入柠檬酸循环。脂肪酸不能充当脑的燃料，因为它们与白蛋白结合，所以不能越过脑血屏障。从本质上看，酮体是可以运输的脂肪酸等效物。后面即将讨论到，在燃料利用方面，从葡萄糖转换为酮体有一个重要的效果，即可以把饥饿时的蛋白质分解降到最低限度。

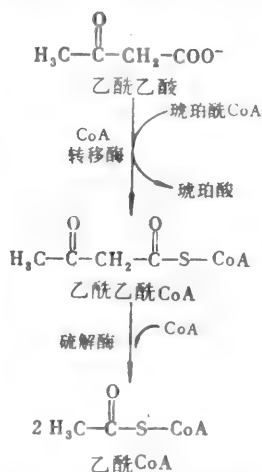


图23-12 酮体进入柠檬酸循环

2. 肌肉 肌肉的主要燃料是葡萄糖、脂肪酸和酮体。肌肉与脑不同，它有大量的糖原贮存（1,200kcal）。事实上，人体内全部糖原约有四分之三贮存于肌肉（表23-1）。在进食之后，肌肉内的糖原含量可以高达1%。这种糖原可以很快地转变为葡糖6-磷酸，供肌肉细胞内使用。肌肉和脑一样地缺乏葡糖6-磷酸酯酶，因而它不向外运输葡萄糖。确切地说，肌肉保留葡萄糖，这是它最偏爱的燃料，以供突然活动的需要。在活跃地收缩着的骨骼肌内，糖酵解的速度远远超过柠檬酸循环的速度。在这种条件下形成的丙酮酸大部分被还原成乳酸，后者流入肝，并在肝内转变成葡萄糖（图23-13）。这些相互转变称为科里（Cori）循环（270页），可以把肌肉的部分代谢负担转嫁给肝。此外，有大量丙氨酸通过丙酮酸的转氨

表23-1 典型的体重为70kg的男人的燃料贮存

	可利用的能量 (kcal)		
	葡萄糖或糖原	三酰基甘油	可动员的蛋白质
血液	60	45	0
肝	400	450	400
脑	8	0	0
肌肉	1,200	450	24,000
脂肪组织	80	135,000	40

引自G.F.Cahill, Jr., *Clin. Endocrinol. Metab.* 5(1976): 398.

作用在活跃的肌肉内形成。丙氨酸和乳酸一样，可以被肝转变为葡萄糖。静止肌肉的代谢情

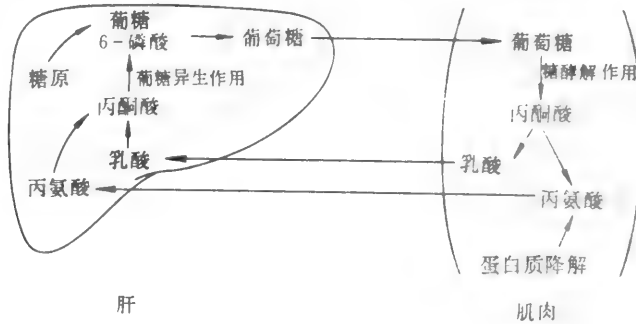


图23-13 肌肉和肝之间的代谢性相互交换。

况则很不相同。在静止肌肉内，脂肪酸是主要燃料。酮体也可以充当心肌的燃料。事实上，心肌优先消耗乙酰乙酸，其次才是葡萄糖。

3. 脂肪组织 贮存在脂肪组织里的三酰基甘油是一个巨型的代谢燃料库。对一个典型的体重为70公斤的男人来说，他们贮存的能量含量为135,000kcal。脂肪组织是特化的，专门使脂肪酸酯化并从三酰基甘油释放。肝是人体内脂肪酸合成的主要部位，因此脂肪组织的主要生物合成任务是把这些脂肪酸活化，并将由此形成的 C o A 衍生物转移给甘油。甘油3-磷酸是这个生物合成中的关键性中间产物（349页），它来自二羟丙酮磷酸的还原。二羟丙酮磷酸是在糖酵解途径中由葡萄糖形成的。脂肪细胞不能使内源的甘油磷酸化，因为它们缺少激酶。因此，为了合成三酰基甘油，脂肪细胞需要葡萄糖。脂酶把三酰基甘油水解成脂肪酸和甘油。从三酰基甘油上释放出第一个脂肪酸是限制速度的步骤，它由一个对激素敏感的脂酶催化，而这个脂酶可以可逆地磷酸化。和在糖原代谢中一样，环AMP是这个由激素触发的放大级联反应里的中间产物。在脂肪细胞里，三酰基甘油不断地被水解和重新合成。由他们水解所产生的甘油被输出到肝（图23-14）。如果有充裕的甘油3-磷酸存在，水解所产生的脂肪酸大部分重新酯化。与此相反，如果由于葡萄糖贫乏而使甘油3-磷酸不足，这些脂肪酸就被释放入血浆。因此，脂肪细胞内的葡萄糖水平是一个重要的因素，它可以决定脂肪酸是否释放入血液。

4. 肝 在为脑、肌肉及其它外周器官提供燃料方面，肝的代谢活动是必要的。肠所吸收的多数化合物都通过肝，这使得肝能调节血液里许多代谢物的水平。肝可以摄取大量的葡

葡萄糖，并将它转变为糖原。用这种方式可以贮存多达400kcal。肝可以将自己贮存的糖原分解，并且实行葡糖异生作用，从而将葡萄糖释放进入血液。葡萄糖的主要前体是来自肌肉的乳酸和丙氨酸，来自脂肪组织的甘油和来自饮食的可生成葡萄糖的氨基酸。在调节脂肪代谢方面，肝也起重要的核心作用。当燃料充裕的时候，脂肪酸由肝合成、酯化，并且以极低密度脂蛋白（VLDL）的形式分泌入血液（图23-15）。这种血浆脂蛋白是脂肪组织合成三酰基甘油所

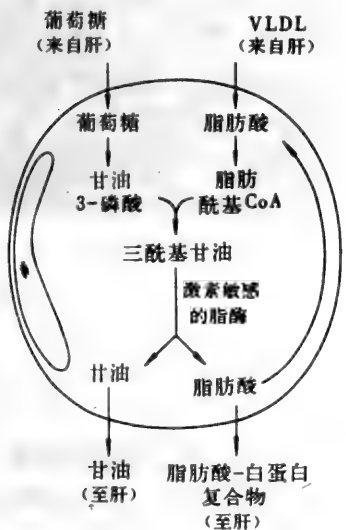


图23-14 脂肪组织使三酰基甘油合成和降解。脂肪酸以极低密度脂蛋白(VLDL)的形式送到脂肪细胞。

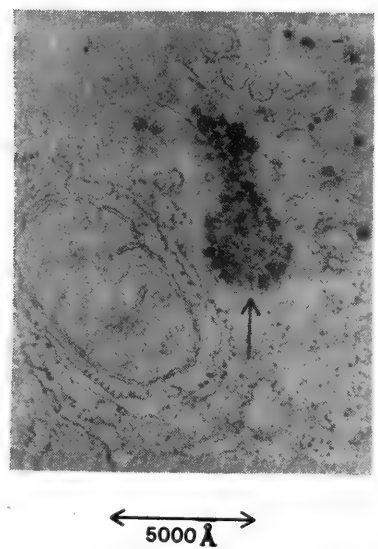
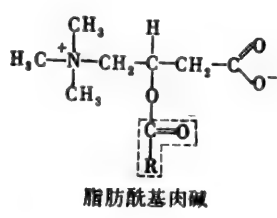


图23-15 部分肝细胞的电镜显微照片。该细胞正活跃地从事极低密度脂蛋白(VLDL)颗粒的合成和分泌。箭头指向一个泡囊,它正在将自己所包含的VLDL颗粒释放出来。[蒙Dr. George Palade 特许。]

用的主要脂肪酸来源（图23-16）。但是，在禁食状态下，肝把脂肪酸转变为酮体。肝细胞是怎样在这两条相反的途径中做出选择的呢?不同的抉择决定于脂肪酸是否进入线粒体间质。请回忆，只有当长链的脂肪酸与肉碱酯化时，它们才能穿过线粒体内膜（295页）。在这种膜

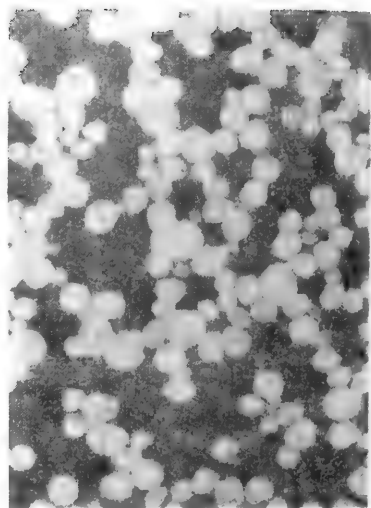


的外侧催化酰基肉碱形成的酶受丙二酸单酰 CoA 抑制。在脂肪酸合成中，丙二酸单酰 CoA 是关键性的中间产物。因此，当长链脂肪酸正在合成的时候，它们不能进入线粒体间质，这个间质是β-氧化作用和酮体形成的区域。而是这些脂肪酸被掺入三酰基甘油和磷脂类中。与此相反，当燃料稀缺时，丙二酸单酰 CoA 的水平很低。在这些情况下，从脂肪组



织释放出来的脂肪酸进入线粒体间质,以供转变成酮体。但是肝脏又是怎样来满足它自己的能量需要呢?作为它本身的燃料,氨基酸降解所产生的酮酸比葡萄糖更好。事实上,在肝内进行的糖酵解的主要目的就是形成生物合成所需要的构造单元。此外,肝不能利用乙酰乙酸做燃料,因为它缺少将乙酰乙酸活化成乙酰 Co A 的转移酶。这样,肝就避开不用它向肌肉和脑输出的燃料,成为一个真正的予而不取的器官。

图23 16 极低密度脂蛋白(VLDL)颗粒的电镜照片。这些颗粒的直径范围为300至800Å,它们把三酰基甘油从肝携带到脂肪组织。  
[蒙Dr. Robert Mahley 特许。]



## 燃料代谢的激素调节剂

在把代谢作用整合为一体方面,激素起关键性的作用。特别是胰岛素、胰高血糖素、肾上腺素和去甲肾上腺素,对于燃料的贮存和动员以及代谢作用的有关方面,都有很大的影响:

1. 胰岛素 这个蛋白质激素(15和659页)由胰脏的 $\beta$ 细胞分泌,分子量为5.8kda,是燃料代谢的最重要的调节剂。从本质上说,胰岛素是饱食状态的信号:它以多种方式促进燃料的贮存和蛋白质合成。肌肉和肝脏内的糖原合成都得到促进,而肝的葡糖异生作用则受到抑制。胰岛素加速肝内的糖酵解作用,这又进而增加脂肪酸的合成。胰岛素也促进葡萄糖进入肌肉和脂肪细胞。大量脂肪酸和葡萄糖在脂肪组织内存在,引起三酰基甘油的合成和贮存。胰岛素的作用也涉及氨基酸和蛋白质的代谢。胰岛素促使肌肉摄取支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸),这有利于增多肌肉蛋白。实际上,胰岛素对于蛋白质合成有普遍的促进作用。此外,它还抑制细胞内的蛋白质降解作用。

2. 胰高血糖素 低血糖水平使胰脏的 $\alpha$ -细胞分泌这个分子量为3.5kda的多肽激素(279页)。胰高血糖素的主要靶器官是肝脏。胰高血糖素通过触发由环AMP调节的级联反应来促进糖原降解和抑制糖原合成,这些级联反应导致磷酸化酶和糖原合成酶发生磷酸化作用(282页)。胰高血糖素也通过减少丙酮酸合成和降低乙酰 Co A 羧化酶活力来抑制脂肪酸合成。此外,胰高血糖素还使葡糖异生作用增强。胰高血糖素这些作用的总效果是使肝脏释放葡萄糖的数量显著增加。另外,胰高血糖素还提高脂肪细胞里环AMP的水平,从而促进三酰基甘油的分解。

3. 肾上腺素和去甲肾上腺素 低血糖水平引起肾上腺髓质和交感神经末梢分泌这些儿茶酚胺激素。它们和胰高血糖素一样,通过触发由环AMP调节的级联反应,来促进糖原和三酰基甘油的动员。但是它们的糖原分解作用在肌肉中比在肝脏中强,这是它们与胰高血糖素的不同之处。儿茶酚胺的另一个作用是抑制肌肉对葡萄糖的摄取。替代的办法是把脂肪组



组织释放的脂肪酸用做燃料。肾上腺素也刺激胰高血糖素的分泌，而抑制胰岛素的分泌。因此，儿茶酚胺增加肝向血液中释放葡萄糖的数量，而降低肌肉对葡萄糖的利用。

血液葡萄糖的水平由肝缓冲

人在禁食过夜之后，典型的血糖水平是80mg/100ml (4.4 mol/L)。血糖水平在一天之内的正常变化范围约为进食前的80mg/100ml到进食后的120mg/100ml。尽管葡萄糖的输入量和消耗量变化很大，但血糖水平却相对恒定，这是怎样维持的呢？主要的控制要素前面已经讨论过，这里只需予以归纳。血糖水平主要是由肝的活动控制的，肝可以针对激素信号及葡萄糖本身的水平而摄取或释放大量的葡萄糖(图23-17)。

在吃过一顿含糖类的饮食之后，血液中葡萄糖浓度升高，造成肝脏内葡糖6-磷酸的水平也升高，因为只有在这种情况下，葡糖激酶的催化部位才变成充满葡萄糖。请回忆一下，葡糖激酶和己糖激酶不同，它对葡萄糖的 $K_M$ 值很高( $\sim 10\text{mmol/L}$ ，比禁食时的血糖水平4.4mmol/L高)，并且不受葡糖6-磷酸抑制。结果，当血糖水平高时，肝脏形成葡糖6-磷酸的速度加快。然后葡糖6-磷酸的命运主要受胰高血糖素和胰岛素控制，二者作用相反。胰高血糖素触发环AMP调节的级联反应(283页)，造成糖原分解，而胰岛素的作用与此拮抗。高血糖水平造成胰脏分泌胰高血糖素的量减少，而胰岛素量增加。因此，血糖水平高时，糖原迅速合成。激素对于糖原合成和贮存的这些影响，又由于葡萄糖本身的直接作用而得到加强。在前面的章节里(284页)已经讨论过，磷酸化酶a除了是分解糖原的酶以外，还同时是葡萄糖的感受器。当葡萄糖的水平高时，葡萄糖与磷酸化酶a结合，使它对磷酸酯酶的作用敏感，被转变为不能降解糖原的磷酸化酶b。这种转变也释放磷酸酯酶，从而使它能激活糖原合成酶。因此，葡萄糖通过变构作用使糖原系统从降解型转变为合成型。

饱食状态下的高胰岛素水平也促进葡萄糖进入肌肉和脂肪组织。肌肉以及肝脏合成糖原的作用都受胰岛素的刺激。事实上，由于肌肉质量大，它能贮存糖原的数量约相当于肝的三倍。葡萄糖进入脂肪组织，为三酰基甘油的合成提供了甘油3-磷酸。

进餐后经过数小时，血糖水平就开始降低，这使胰岛素的分泌量减少，而胰高血糖素(图23-18)的分

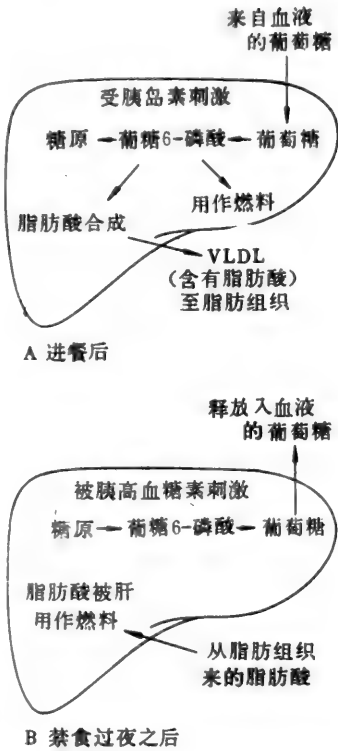


图23-17 肝对血液葡萄糖水平的控制。

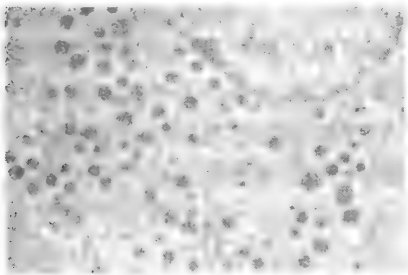


图23-18 电镜照片示出胰脏 $\alpha$ 细胞内含胰高血糖素的颗粒。[蒙Dr. Arthur Like特许。]

泌量增多。这时上述的作用逆转。由环-AMP 调节的级联反应被激活，造成磷酸化酶 *a* 的水平升高，而糖原合成酶 *a* 的水平降低。激素对这套级联反应的影响还由于葡萄糖与磷酸化酶 *a* 的结合减少而得到加强，这使磷酸化酶 *a* 对磷酸酯酶水解作用的敏感性降低。相反，磷酸酯酶保持与磷酸化酶 *a* 相结合，所以合成酶继续以不活跃的磷酸化的形式存在。结果，糖原被迅速动员。来自糖原的葡萄糖 6-磷酸经水解作用形成大量葡萄糖，然后从肝脏释放入血。肌肉和脂肪组织减少葡萄糖的消耗，也有助于维持血糖水平。由于胰岛素水平低，葡萄糖进入肌肉和脂肪组织减少。当血糖水平降低时，肌肉和肝都把脂肪酸用作燃料。因此，有三种主要的因素把血糖保持在约高于 80mg/100ml 的水平上：肝脏动员糖原和释放葡萄糖，脂肪组织释放脂肪酸以及肌肉和肝脏所使用的燃料从葡萄糖改变为脂肪酸。

### 长期饥饿下的代谢性适应使蛋白质降解减到最少

我们现在转向讨论长期饥饿下的代谢性适应问题。一个典型的体重为 70 公斤的男人在开始饥饿之前所具有的燃料贮备约为：糖原 1,600kcal，可动员的蛋白质 24,000kcal 和三酰基甘油 135,000kcal (表 23-1)。一个 24 小时周期的能量需要范围约为基态的 1,600kcal 到 6,000kcal，视活动量而定。因此，贮备的燃料足以应付饥饿一至三个月的热量需要。但是，糖类的贮备仅在一天之内即已耗竭。虽然是在这种情况下，血糖水平仍然维持在 50mg/100ml 以上。脑不能忍受更低的葡萄糖水平，即便是短时间也不行。因此，当饥饿时，在代谢方面首先要考虑的问题，是为脑和其它组织（如红血细胞）提供足够量的葡萄糖，因为这些组织完全依赖葡萄糖做燃料。但是，葡萄糖的前体并非十分丰富。大部分的能量都贮存在三酰基甘油的脂肪酰基部分。请回忆，脂肪酸是不能转变为葡萄糖的，因为乙酰 CoA 不能转变为丙酮酸（301 页）。三酰基甘油的甘油部分可以转变成葡萄糖，但是可供利用的数量有限。唯一可能的葡萄糖的其它来源是由蛋白质分解产生的氨基酸。

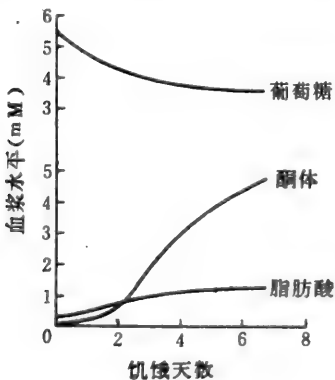


图 23-19 在饥饿期间血浆中脂肪酸和酮体的水平升高，而葡萄糖的水平降低。

质分解产生的氨基酸。在饥饿时，肌肉是最大的氨基酸的可能来源。但是，多数人的存活要依靠有行动的能力，而这就需要大量的肌肉。因此，当饥饿时，在代谢方面第二个要考虑的问题是保存蛋白质。这可以通过把消耗的燃料从葡萄糖改变为脂肪酸和酮体来实现（图 23-19）。

第一天饥饿的代谢改变和禁食过夜时情况相同。低血糖引起胰岛素分泌量减少，而胰高血糖素的分泌量增加。占主导地位的代谢过程是脂肪组织中三酰基甘油的动员和肝的葡糖异生作用。肝把脂肪组织所释放的脂肪酸氧化，从而获得它本身所需要的能量。结果乙酰 CoA 和柠檬酸的浓度升高，这使糖酵解作用停止。由于胰岛素的浓度水平低，肌肉吸收葡萄糖的数量显著减少，而脂肪酸可以自由地进入。因此肌肉也把燃料从葡萄糖改变为脂肪酸。肌肉对脂肪酸的  $\beta$ -氧化使丙酮酸转变为乙酰 CoA 的作用中断。因此，丙酮酸、乳酸和丙氨酸被输出到肝，以供转变成葡萄糖。肌肉蛋白质的蛋白水解可以提供一部分这些葡萄糖的三碳前体。三酰基甘油分解所产生的甘油是肝脏合成葡萄糖的另一原料。

经过约三天饥饿之后，最重要的变化是肝形成大量的乙酰乙酸和3-羟基丁酸（酮体）（图23-20）。它们来自乙酰CoA的合成显著增加，因为柠檬酸循环不能把由脂肪酸降解所产生的乙酰单位全部氧化。葡糖异生使草酰乙酸供应耗尽，而后者是乙酰CoA进入柠檬酸循环所必需的。结果，肝制造大量酮体，并将它们释放入血。这时，脑开始消耗相当多的乙酰乙酸，以代替葡萄糖。在饥饿三天之后，脑的能量需要约有三分之一由酮体来满足（表23-2）。心脏也利用酮体作燃料。在燃料使用方面的这些变化被称为酮病。

表23-2 饥饿时的燃料代谢

燃料交换和消耗	24小时内形成或消耗量（g）	
	第3天	第40天
脑消耗的燃料		
葡萄糖	100	40
酮体	50	100
一切其他葡萄糖消耗量	50	40
燃料动员		
脂肪组织的脂解作用	180	180
肌肉蛋白质降解	75	20
肝制造燃料的产量		
葡萄糖	150	80
酮体	150	150

饥饿几个星期之后，酮体变成脑的主要燃料（表23-2）。这时脑每天只需要40克葡萄糖，而在饥饿的第一天时，约需要120克。肝有效地把脂肪酸转变为酮体，以及脑对酮体的使用，显著地降低了对葡萄糖的需要量。因此，这时肌肉的降解量比开始饥饿的前几天内减少。只需20克的肌肉降解，而开始饥饿时为75克，这对存活来说是至关重要的。持续饥饿而不丧失生命，主要决定于三酰基甘油贮存量的多少。

大量存贮的脂肪使候鸟能长距离飞行

候鸟提供了另一个突出的例子，说明三酰基甘油的生物学意义。有些陆生小鸟在秋天从它们在新英格兰的繁殖地飞往西印度群岛的越冬地，然后在春天再重新飞回来。它们不停顿地飞越海洋的距离约为2400公里。这些鸟维持每小时40公里的速度，连续60小时。这个了不起的业绩之所以成为可能，是由于有极大量脂肪贮备的存在，它们在这个长距离飞行的过程中可以被有效地动员。短距离迁飞的鸟或完全不迁飞的鸟都很瘦。它们的脂肪率约为0.3；脂肪率的定义是体重中脂肪总干重与非脂肪部分的总干重之比。与此相反，长距离迁飞的鸟在准备大陆上空旅行之前，就变得比较肥胖，然后在它们开始飞越海洋的前夕，变得非常肥胖。实际上这时它们的脂肪率已经接近于3。红喉蜂鸟在一天之内每增加1克体重，就积累0.15克三酰基甘油。与人相比，相应的增重是每天10公斤。候鸟积累的脂肪都贮存在皮下、腹腔、肌肉和肝内。在跨越水域的长距离飞行中，这种贮存的脂肪约有三分之二被消耗。燃料改为利用脂肪酸和酮体的转变必是很快的，因为在这60小时的飞行中，几乎没有蛋白质降解。脂肪氧化也为这些鸟提供了必要的水分，以弥补通过呼吸道丢失的水。三酰基甘油充当燃料贮备的效率很高，这一点也是值得注意的。请回忆由于三酰基甘油是无水的，而且是高度还原的状态（292页），它所储存的能量为糖原的六倍。如果一只候鸟携带同等数量的糖原形式的

燃料，那么它将永远不能离地起飞！

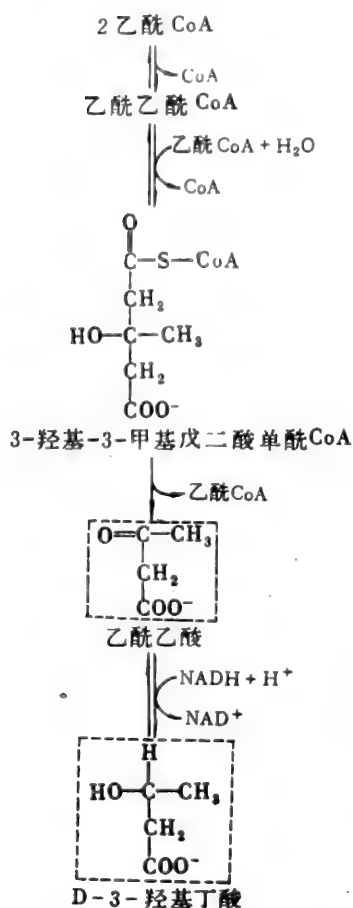


图 23-20 肝脏合成酮体。



红喉蜂鸟

## 概 要

代谢的基本战略是形成 ATP，它是还原能力和生物合成所需要的构造单元。这些反应的复杂网络受许多因素的控制，如变构相互作用，可逆共价修饰，酶的数量变化，区域化作用以及代谢上分别独立的器官之间的相互作用。催化一个途径里关键步骤的酶通常是最重要的控制部位，糖酵解中的磷酸果糖激酶和脂肪酸合成中的乙酰 CoA 羧化酶就是范例。像葡糖异生和糖酵解这样的相反途径的调节，常常是相互对立的，当一个途径休止时，另一个途径正是高度活跃。糖原合成和降解是另外一对相反的反应序列，它们由一组激素触发的放大级

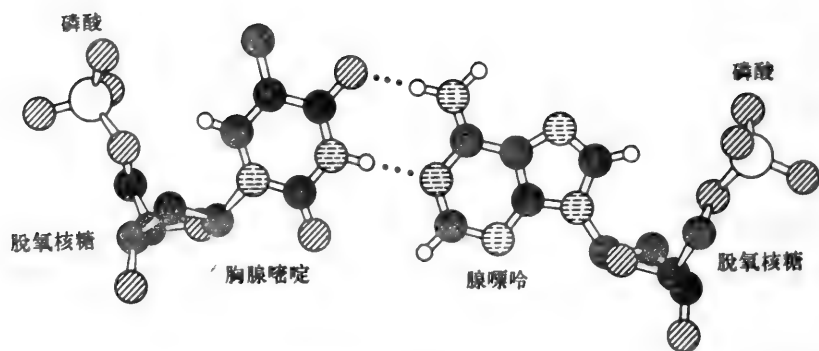
联反应协调控制，这些反应导致糖原合成酶和磷酸化酶的磷酸化。区域化控制的作用可以用胞液和线粒体间质中脂肪酸的相反命运来说明。

脑、肌肉、脂肪组织和肝的代谢情况很不相同。对一个吃饱的人来说，葡萄糖基本上是脑的唯一燃料。在饥饿时，酮体（乙酰乙酸和3-羟基丁酸）成为脑的主要燃料。肌肉利用葡萄糖、脂肪酸和酮体作燃料，它并且还合成糖原，作为本身所需要的燃料贮备。脂肪组织专门合成、贮存和动员三酰基甘油。肝的多种代谢活动支持其它器官。肝可以迅速动员糖原，并实行葡糖异生作用，以满足其它器官对葡萄糖的需要。在脂类代谢的调节方面，肝起核心作用。当燃料充裕时，脂肪酸被合成、酯化，并以极低密度脂蛋白（VLDL）的形式从肝运往脂肪组织。但是，在禁食状态下，肝把脂肪酸转变为酮体。这些器官的活动由激素来整合统一。胰岛素发出饱食的信号：它刺激糖原和三酰基甘油的形成及蛋白质的合成。与此相反，胰高血糖素发出低血糖水平的信号：它刺激肝的糖原分解和葡糖异生作用，还有脂肪组织的三酰基甘油水解作用。肾上腺素和去甲肾上腺素对燃料的作用和胰高血糖素一样，但它们的主要靶子是肌肉而不是肝。

饱食人的典型血糖水平范围是80 mg/100 ml到120 mg/100 ml。进食之后，血糖水平升高，导致胰岛素的分泌量增加，而胰高血糖素的分泌量减少。结果，糖原在肌肉和肝内合成。葡萄糖进入脂肪组织的数量增多，为三酰基甘油合成提供了甘油3-磷酸。几小时后，当血糖水平降低时，这些效果逆转。然后葡萄糖通过糖原降解和葡糖异生途径形成，而脂肪酸则通过三酰基甘油水解来释放。这时肝和肌肉改为利用脂肪酸来满足自身的能量需要，而不再利用葡萄糖，以便把葡萄糖保存起来，专供脑和其它非常依赖于葡萄糖的组织使用。饥饿时的代谢性适应的设计把蛋白质降解减到最少。在饥饿开始的几天之内，肝就从脂肪酸形成大量酮体，并将它们释放入血。饥饿几个星期之后，酮体成为脑的主要燃料。对葡萄糖的需要量减少。可以降低肌肉分解的速度，因而存活的可能性也得到加强。

# 第四篇 信息： 遗传信息的储存、传送及表达

(林性玉 章有章 译，张惠珠 校)



DNA 双螺旋的一对脱氧核糖核苷酸单位的模型。在这个碱基对中，腺嘌呤和胸腺嘧啶之间形成氢键。

## 第24章 DNA：遗传作用、结构和复制

脱氧核糖核酸 (DNA) 是遗传分子。它是由大量的脱氧核糖核苷酸组成的极长的线状大分子。DNA 中的嘌呤和嘧啶碱基携带遗传信息，其中的糖和磷酸基团则起结构作用。本章描述 DNA 的结构、遗传作用及其复制。这里将着重讨论原核生物中的 DNA，因为它们比较简单并可作为范例来说明适合所有生物的原理。真核生物染色体将在第 29 章讨论。

### DNA 的共价结构和命名

DNA 分子的骨架是由磷酸二酯键连接的许多脱氧核糖组成，并在整个分子中不变。一个脱氧核糖核苷酸中的糖部分的 3'-羟基，通过一个磷酸二酯键与邻接的糖的 5'-羟基相联。DNA 的可变部分是它的碱基的顺序。DNA 含有四类碱。二种嘌呤碱是腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G)，二种嘧啶碱是胸腺嘧啶 (T) 和胞嘧啶 (C)。DNA 链的结构示于图 24-1 和 24-2。

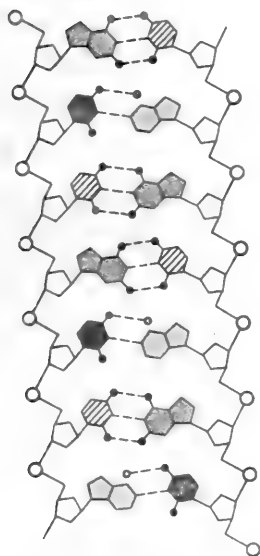
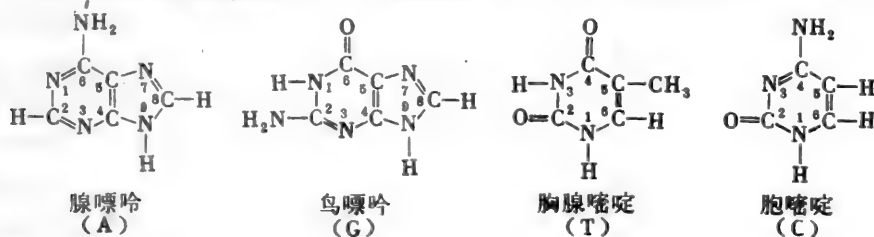


图 24-1 DNA 结构的示意图。两旁的空心圆块表示糖-磷酸酯骨架，而中间的实心点块表示嘌呤和嘧啶碱。[依据 A. Kornberg. The synthesis of DNA. Copyright © 1968 by Scientific American, Inc.]

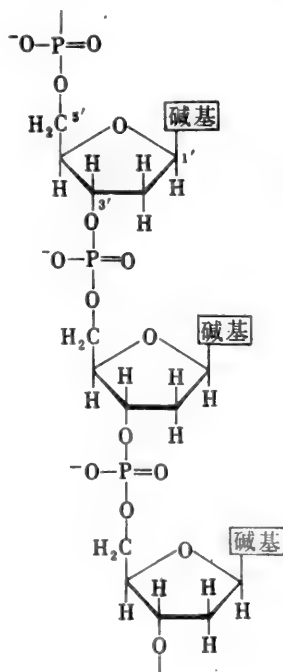
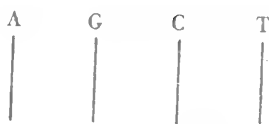
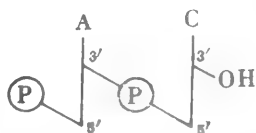


图 24-2 DNA 链的部分结构。

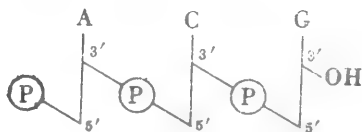
一个DNA链的结构可简明地以下式表示。四种主要的脱氧核糖核苷酸的符号为：



其中直线表示糖，而A，G，C和T代表碱基。下图中斜线之间的Ⓟ表示一个磷酸二酯键。这条斜线将一根直线的末端同另一根的中间连起来。两个连结点分别表示5'-OH和3'-OH。在此例中，符号Ⓟ表明脱氧腺苷酸盐通过一个磷酸二酯桥与脱氧胞苷相连。脱氧腺苷酸盐的3'-羟基通过一个磷酸基同脱氧胞苷的5'-羟基连在一起。



假设一个脱氧鸟苷酸盐又与这个二核苷酸中的脱氧胞苷单位联接，那么形成的三核苷酸就可用下图表示：



这个三核苷酸可简记为pApCpG或ACG。

**DNA链是有极性的。**链的一端是一个5'-OH，另一端是一个未与其它核苷酸相连的3'-OH。按惯例，符号ACG指5'-OH末端在脱氧腺苷上，3'-OH末端在脱氧鸟苷上。因此，碱基的顺序是沿5'→3'方向书写的。我们记得蛋白质中的氨基酸顺序是按氨基→羧基方向书写的。应注意ACG和GCA代表不同的化合物，正如同Glu Phe Ala与Ala Phe-Glu不是一种化合物一样。

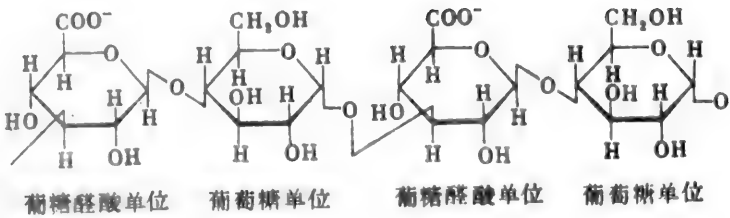
## 肺炎球菌被DNA转化的事实

揭示了基因是由DNA组成的

在发现DNA的遗传作用中肺炎球菌起了重要作用。肺炎球菌通常外包有一层粘性发光的多糖荚膜。这一外层是细菌致病性的必要成分，它导致人类以及其它敏感哺乳动物的肺炎。缺乏多糖外壳的突变种是非致病性的。正常的细菌称作S型（因为它形成光滑的菌落），而那些无荚膜的变种称作R型（因为它们形成粗糙的菌落）。有一组R变种缺乏将UDP-葡萄糖转化成UDP-葡萄糖醛酸的脱氢酶。这种酶是合成荚膜多糖必不可少的；此多糖在一种肺炎球菌中



是由葡萄糖和葡萄糖醛酸以交替顺序组成的。



1928年，格里菲思，F. (Fred Griffith) 发现一种非致病性的R 变种可以通过以下途径转化为致病性的S 型。他将活的R 型和经加热杀死的S 型肺炎球菌混合液注入小鼠。惊人的发现是：这种混合液使小鼠致死，而单独活R 型或经加热杀死的S 型都不能使小鼠死亡。在致死的小鼠血液中发现了活的S 型肺炎球菌。因此，加热杀死的S 型肺炎球菌以某种方式将活R 型转化成了活S 型肺炎球菌。这一转变而且是永久性的：转化的细菌还能产生致病性的S 型后代。随后人们发现这种R →S 转化可在体外进行。有些培养的R 型细胞在加入加热杀死的S 型肺炎球菌的无细胞抽提物后，被转化成S 型。这个发现为阐明“转化要素”化学本质的研究开辟了天地。

加热杀死的S 肺炎球菌无细胞抽提液经分级分离，各组分的转化活性也被一一测定（图24-3）。1944年，艾弗里，O. (Oswald Avery), 麦克劳德，C. (Colin MacLeod) 和麦卡蒂，M. (Maclyn McCarty) 发表了他们的发现“脱氧核糖型的核酸是Ⅲ型肺炎球菌转化要素的基本单位”。这个结论的实验根据是：（1）纯化的，具高度活性的转化要素的化学元素分析与计算出来的DNA组成非常接近；（2）纯化的转化要素在光学、超速离心、扩散和电泳性质上与DNA的相似；（3）其转化活性不因抽取去除蛋白质或脂类而损失；（4）胰蛋白酶和糜蛋白酶不影响其转化活性；（5）核糖核酸酶（已知能消化核糖核酸）对转化活性无影响；（6）相反，在加入脱氧核糖核酸酶后，转化活性丧失了。

这项工作是生物化学发展史上的一个里程碑。直到1944年，一般都认为携带遗传信息的是染色体蛋白质，而DNA只扮演一个次要角色。当时流行的这一观点被精确证明的发现纯化DNA具有遗传特异性所彻底粉碎。艾弗里于1943年，在给其兄弟，另一个大学的医学微生物学家的信中生动地描述了这个研究及其含义（图24-4）。



图24-3 非致病性R 型肺炎球菌（小菌落）被加热杀死的S 型肺炎球菌的DNA 转化为致病性肺炎球菌（大发光菌落）。[引自O. T. Avery, C. M. MacLeod, and M. McCarty. *J. Exp. Med.* 79(1944): 158.]

近两年来，我先与麦克劳德，现在又与麦卡蒂博士一起，一直在试图找出引致这一特异变化的细菌抽提液中的这个物质的化学本质。Ⅲ型球菌的粗抽提液中含有荚膜多糖、C（脂质）糖类、核蛋白、酵母及胸腺两类的游离核酸，脂类以及其他细胞组分。试图从这个复杂的混合物中寻取活性成分！试图分离并从化学方面证明这一特定物质：当这物质与来自Ⅱ型球菌的R细胞接触时，能使后者制造Ⅲ型荚膜多糖，使后者获得抽提液特异来源细胞的所有各种宝贵特性！真是艰巨的工作，有多少头痛和心碎的经历啊。但是，最后，也许我们找到它了。

……假如证明我们是对的话——当然这仍是个大大的假定——那么它意味着诱导刺激物质的化学本质及产生的物质的化学结构就都清楚了，前者是胸腺核酸，后者是Ⅲ型多糖；此二者并将于不再加入诱导物的子代细胞中再行重制和无数次地传代，并从中可获得在数量上大大超过原用于诱导反应的同一活性转化物。听起来它象是一个病毒或一个基因。但对机制问题我现在还不关心。应当一步步地做工作，而第一步是弄清转化要素的化学本质。其它问题可由别人解决。当然这一课题的含义涉及广泛。它触及胸腺型核酸的生物化学；已知核酸是染色体的主要成分，但一直认为无论其来源和种属如何，核酸都是一样的。它触及遗传学酶化学、细胞代谢和糖的合成。然而，今天，还需要大量经考验的证据才能使人们相信不含蛋白质的脱氧核糖核酸钠盐赋予了这一生物学的特异活性。我们现在正在试图得到这个证据。吹肥皂泡是充满乐趣的，但更聪明一些是先由自己而不让别人去戳破它。

图24-4 艾弗里，O. (Oswald Avery) 1943年5月给他兄弟罗伊(Roy)的信(手稿)的一部分。[引自R. D. Horchkiss, In *Phage and the Origins of Molecular Biology*, J. Cairns, G. S. Stent, and J. D. Watson, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1966), pp. 185-186.]

DNA的遗传作用的进一步肯定来自对一个感染大肠杆菌的病毒的研究。T2噬菌体含一个DNA核心，外面绕以蛋白质外壳。1951年，赫里奥特，R. (Roger Herriott) 提出“病毒的作用可能象一个充满着转化因素的注射针；这样的病毒本身不会进入细胞；它仅用尾部接触宿主并可能通过酶作用在外膜上钻一小孔，然后病毒头部的DNA就钻入细胞。”赫尔希，A. (Alfred Hershey) 和蔡斯，M. (Martha Chase) 用下面方法检验了这个观点。用放射性同位素 $^{32}\text{P}$ 标记噬菌体DNA，并用 $^{35}\text{S}$ 标记其蛋白质外壳。这些标记具高度专一性，因DNA不含硫而蛋白质外壳不含磷。用标记的噬菌体去感染培养的大肠杆菌，经短期保温后噬菌体就附着于细菌上。然后将悬浮物在韦林(Waring)搅切器中，以10,000r/min的速度旋切几分钟。这一处理使被噬菌体感染的细胞受到强大剪切力，因而细菌与病毒之间的联接被割断。然后将所得悬浮液用足够的高速离心使细菌沉在试管底部。这样，底部小球含有被感染的细菌，而上清液中含有更小的颗粒。分析这些组份中的 $^{32}\text{P}$ 和 $^{35}\text{S}$ 就可确定噬菌体DNA和蛋白质外壳处于哪一组份。这些实验的结果是：

1. 大多数噬菌体DNA存在于细菌中。
2. 大多数噬菌体蛋白质留在上清液中。
3. 搅切处理对被感染的细菌产生下一代病毒的能力几乎没有影响。

其它实验表明，只有不到1%的 $^{35}\text{S}$ 从母体噬菌体转移到下一代病毒中去，而却有30%母体 $^{32}\text{P}$ 在其后代中出现。这些简单而锐利的实验导致下列结论“将噬菌体T2的遗传性和非遗传性部分加以物理性分离是可能的……静止的噬菌体颗粒的含硫蛋白质只存在于保护性外壳中，这个外壳使细菌附着并作为一种使噬菌体DNA注入细胞的工具。这一蛋白质可能对细胞内噬菌体的生长没有作用。DNA具某些功能。根据现有实验不能引伸出进一步的化学

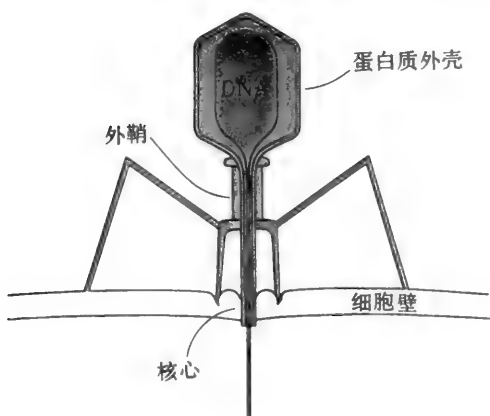


图24-5 T2噬菌体将其DNA注入细菌细胞示意图。[依据W. B. Wood and R. S. Edgar, *Building a bacterial virus*, Copyright © 1967 by Scientific American, Inc.]

结论。”(图24-5)。

这一结论语调谨慎但并不减低其产生的冲击。DNA的遗传作用很快成为普遍接受的事实。赫尔希和蔡斯的实验强有力地支持了八年前艾弗里、麦克劳德和麦卡蒂在另一个体系中的发现。进一步的支持来自对单个细胞中DNA含量的研究。这个研究表明：在一个给定的品系中，所有具二倍体染色体的细胞都含有同量的DNA，而单倍体细胞含DNA的量只有二倍体细胞的一半。

### 某些病毒的基因是由RNA构成的

所有原核生物和真核生物的基因都是由DNA构成的。而在病毒中，基因可由DNA，亦可由RNA构成。能感染烟草类植物叶子的烟草花叶病毒是了解最清楚的一种RNA病毒。它由一个单一RNA分子、外绕以由2,130个相同亚单位（或亚基）构成的蛋白质外壳所组成（其结构及装配将在第30章讨论）。用苯酚处理病毒能将其蛋白质和RNA分离。分离出来的病毒RNA具感染性，而蛋白质则无。利用合成的杂化病毒颗粒也进一步证明病毒的遗传特异性只存在其RNA中。烟草花叶病毒有多种品系。用第一品系病毒的RNA和第二品系的蛋白质制备了一种合成杂化病毒，而用第二品系的RNA和第一品系的蛋白质则合成另一杂化病毒。感染后得到的子代病毒的RNA和蛋白质总是具有用以感染的杂化病毒的RNA的特异性。

### 沃森-克里克（Watson-Crick）的DNA双螺旋

1953年，沃森，J. 和克里克，F. 推导出DNA的三维空间结构并即刻对其复制机理加以揣测。此辉煌成就是生物学历史上最有意义的事件之一，因为它指引了从分子水平去理解基因功能的道路。沃森和克里克分析了由富兰克林，R. (Rosalind Franklin) 和威尔金斯，M. (Maurice Wilkins) 所摄制的DNA纤维的x光衍射图（图24-6），并且导出一个经证明基本正确的结构模型。此模型DNA的要点是：

1. 两条螺旋式多核苷酸链沿着一个共同轴相互盘绕。两链方向相反（图24-7）。

2. 嘌呤和嘧啶碱基处于螺旋内侧，而磷酸及脱氧核糖单位处于外侧（图24-8）。碱基的平面与螺旋轴相垂直。糖的平面与碱基平面几乎成直角。

3. 螺旋的直径为 $20\text{\AA}$ 。相邻碱基在螺旋轴向间距为 $3.4\text{\AA}$ ，旋转夹角为 $36^\circ$ 。因此，螺旋结构在各条链上每隔十个碱基重复一次，即间距 $34\text{\AA}$ 。

4. 两条链被碱基对间的氢键连为一体。腺嘌呤总是与胸腺嘧啶配对，鸟嘌呤总与胞嘧啶配对（图24-9及24-10）。

5. 多核苷酸链中的碱基顺序没有任何限制。遗传信息是由碱基的精确顺序决定的。

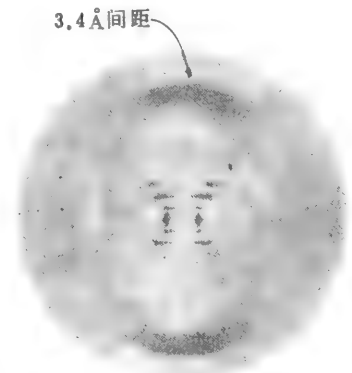


图24-6 一个水化DNA纤维的x光衍射图。图中央的交叉十字是螺旋结构的诊断。子午线上的强弧形是由相距 $3.4\text{\AA}$ 的碱基对堆量而显现。[蒙Dr. Maurice Wilkins特许。]

DNA双螺旋最重要的方面就是碱基配对的特异性。沃森和克里克推导认为，由于空间和氢键形成等因素，腺嘌呤必定与胸腺嘧啶配对，鸟嘌呤必与胞嘧啶配对。空间的限制来自每条多核苷酸链上糖-磷酸根骨架的有规则的螺旋性质。连接在配对的基对上的糖苷键总是相距

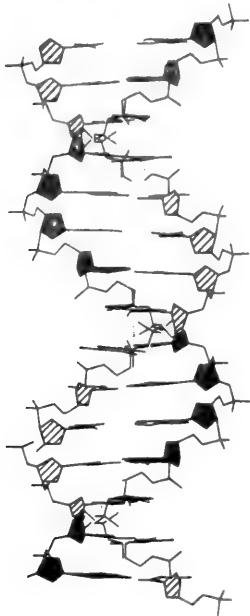


图24-7 DNA双螺旋的骨架模型。此结构间隔34Å重复一次，即在每条链上相当于十个残基。

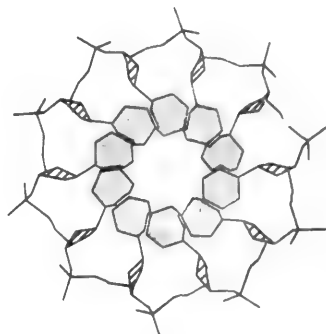


图24-8 DNA双螺旋的一股示意图(沿螺旋轴方向下看)。碱基(此处全部是嘧啶)在内侧，而糖-磷酸根骨架在外面。明显可见螺旋的十重对称性。

10.85Å (图24-11)，一个嘌呤-嘧啶碱基对正好充入这个空间。相反，这个空间对两个嘌呤是不够大了；而对于两个嘧啶却又过大，以致它们相距太远不能形成氢键。因此，在空间因素

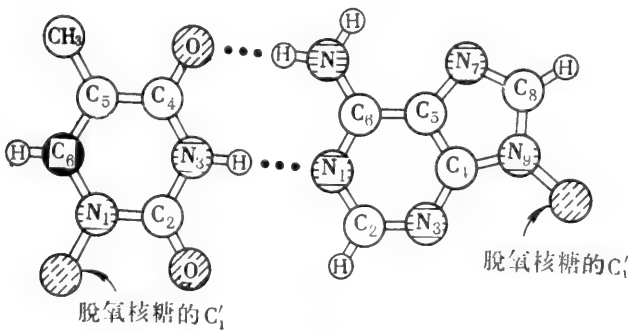


图24-9 腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基对模型。

的作用下，DNA螺旋中的碱基对必需总是一个嘌呤对一个嘧啶。碱基配对又进一步受到要求形成氢键的限制。嘌呤和嘧啶碱基上的氢原子都有明确的位置。腺嘌呤不能与胞嘧啶配对，因为在一个成键位置上有两个氢原子，而在另一成键位置则无氢原子存在。同理，鸟嘌呤也不能与胸腺嘧啶配对。相反，腺嘌呤与胸腺嘧啶形成二个氢键，而鸟嘌呤与胞嘧啶形成三个

氢键（图24-9和24-10）。这些氢键的取向与距离都最适于使碱基之间产生最强的相互作用。

早期对不同品系DNA碱基组成的研究结果也强有力地支持这一碱基配对方案。1950年，查尔加夫，E.（Erwin Chargaff）就发现在研究过的所有物种中，腺嘌呤与胸腺嘧啶，鸟嘌呤与胞嘧啶之比皆接近1.0。但这个当量关系的意义在沃森-克里克模型提出之前一直不明。模型提出后人们才看到这比值反映了DNA结构和功能的精髓——碱基配对的特异性。

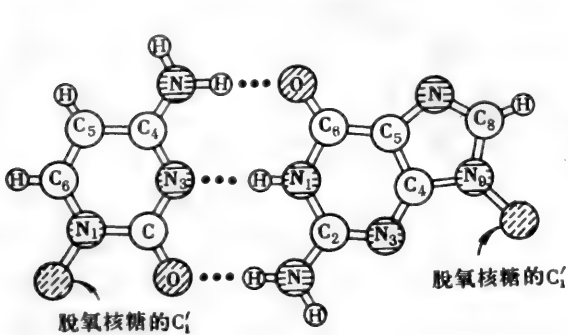


图24-10 鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对模型。

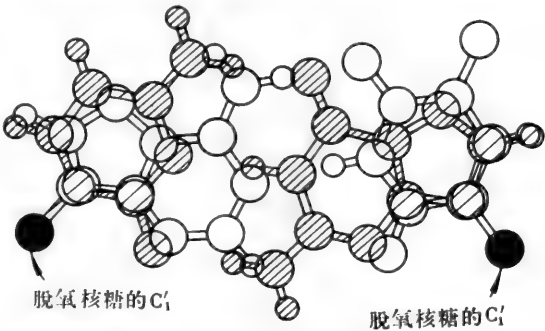


图24-11 一个A-T碱对（无色）重叠在一个G-C碱对上（斜线）。注意两个碱对中的糖苷键和脱氧核糖的C1'原子（黑色）的位置几乎是一样的。

### DNA复制中互补链互为对方的模板

DNA双螺旋模型（图24-12）即刻提供了DNA复制的机理。沃森和克里克在提出他们的结构模型后一个月，又在—篇简洁而流畅的文章中发表了他们的学说：

……如若两条链中的一条上的碱基顺序是给定的，那么人们就可写出另一条链的碱基的准确顺序，因为它们之间有特异的配对关系。因此一条链就是另一条的互补链，也正是这一特点提示了脱氧核糖核酸分子怎样进行自我复制。

以往关于自我复制的讨论常牵涉到模板或模子的概念。人们认为模板或可直接抄录它自己，或可产生一个“反片”，这“反片”再作为模板以生成原来的“正片”。但是这个概念从未能以原子和分子的术语清楚地予以说明。

而我们现在脱氧核糖核酸模型实际上是一对模板，其中的一个与另一个互补。我们想象，在复制之前氢键将断裂，两条链松展而分开。然后每条链都可作为模板为其自身形成一条伙伴链。最终我们将获得两对链，而以前我们只有一对。而且，碱基对的顺序也被精确地复制出来了。

#### DNA的形式

A-DNA：是每圈含约11个残基的双螺旋DNA。在这个右手螺旋中碱基对平面与螺旋轴的垂直线有20°偏离。A-DNA是由B-DNA脱水形成的。

B-DNA：是经典的沃森-克里克双螺旋，每圈含约10个残基。在此右手螺旋中碱基对平面垂直于螺旋轴。

Z-DNA：是每圈约由12个残基组成的左手双螺旋形式的DNA。是由里奇，A.（Alexander Rich）及其同事根据d(CG)<sub>3</sub>的晶体结构提出的。

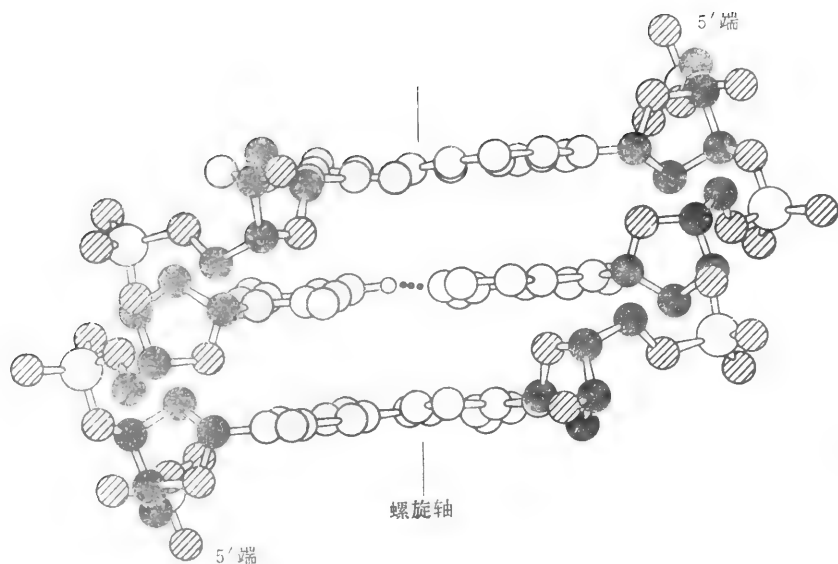


图24-12 DNA分子的双螺旋模型。图示三个碱基对。注意两股DNA的方向相反。

## DNA复制是半保留复制

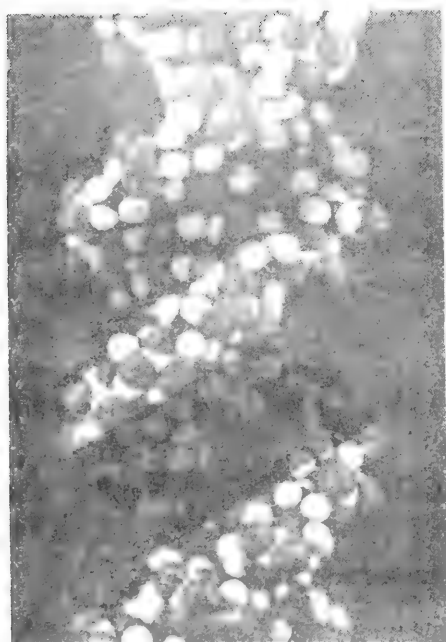


图24-13 DNA双螺旋的空间填充模型。两种沟槽明显可见：一深沟（下面的深色块）和一浅沟（上面的深色块）。注意每个碱基都有一部分是可及的，能与其它分子作用 [蒙Dr. Sung-Hou Kim特许。]

沃森和克里克提出：每个子代DNA分子中，一股是新合成的，而另一股则来自其母体DNA分子。亲代原子的这一分布称为半保留。梅塞尔森，M. (Matthew Meselson) 和斯塔尔，F. (Franklin Stahl) 严格地试验了这个假设。他们用 $^{15}\text{N}$  (N的重同位素) 标记母体DNA，使其密度比一般DNA大。实验是将大肠杆菌放在以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 为唯一氮源的介质中培养繁殖几代。然后将此大肠杆菌突然转移到一个只含 $^{14}\text{N}$  (氮的普通同位素) 的介质中去。其目的是要弄清在几轮复制后， $^{14}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ 在DNA分子中的分布。

$^{14}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的分布可用新发展的密度梯度沉降平衡技术来检测。将少量DNA溶于密度接近于DNA密度 ( $\approx 1.79 \text{ cm}^{-3}$ ) 的氯化铯浓溶液中。将此溶液离心直到接近平衡。离心时，沉降与扩散这两个相对抗的过程使氯化铯在离心池中形成了浓度梯度。结果是建立了一个范围为 $1.66-1.76 \text{ g cm}^{-3}$ 的稳定密度梯度。在此密度梯度中，DNA分子在离心力作用下就停留在密度与DNA浮力密度相同的溶液位置中。大分子量DNA表现出明晰的区带，可由其紫外吸收检测出来。由于 $^{14}\text{N}$  DNA和 $^{15}\text{N}$  DNA分子在密度上约差1%，它们可经密度梯度明确地分

辨开来 (图24-14)。

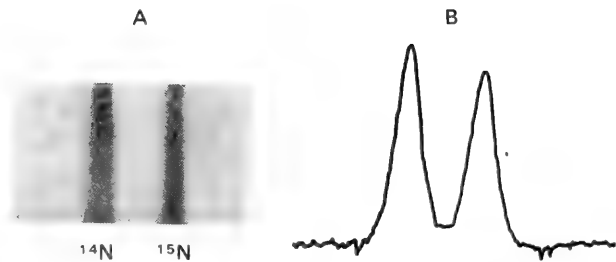


图24-14 密度梯度离心法分辨 $^{14}\text{N}$  DNA和 $^{15}\text{N}$  DNA: (A)离心池的紫外吸收照相; (B)吸收照相的光密度扫描。  
[引自M. Meselson and F. W. Stahl, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1958): 671.]

把细菌从 $^{15}\text{N}$  介质转移到 $^{14}\text{N}$  介质中后, 于不同时间取样以提取其中DNA。将这些样品用密度梯度技术分析所得结果表明, 在繁殖了一代后, 分离得到了一条DNA区带 (图24-15)。

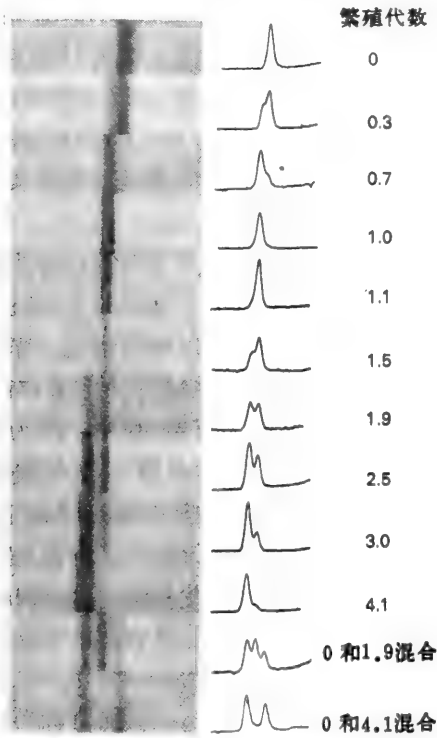


图24-15 密度梯度离心法论证大肠杆菌中的半保留复制。DNA 区带的位置取决于其 $^{14}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ 的含量。繁殖一代后, 所有的DNA 分子都杂化了, 含有相等数量的 $^{14}\text{N}$ 和 $^{15}\text{N}$ 。亲代DNA ( $^{15}\text{N}$ ) 已不复存在 [引自M. Meselson and F. W. Stahl, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1958): 671.]

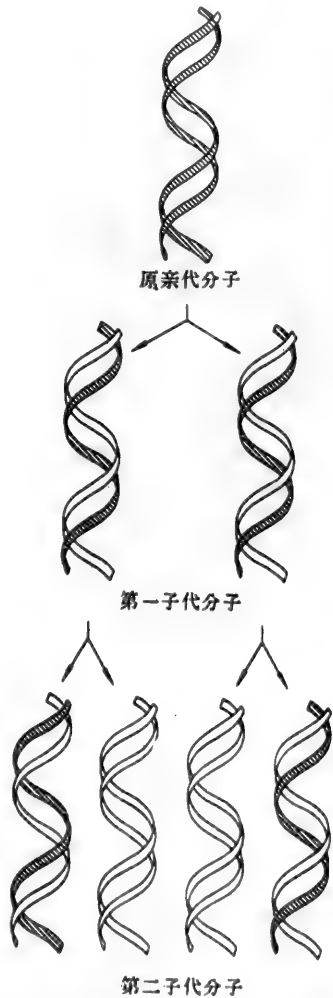


图24-16 半保留复制的示意图。亲代DNA 为深色, 新合成的DNA 为浅色。 [引自M. Meselson and F. W. Stahl, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1958): 671.]

这条区带的密度正好介于 $^{14}\text{N}$  DNA密度及 $^{15}\text{N}$  DNA密度中间。没有得到 $^{15}\text{N}$  DNA区带, 这表明在复制中亲代DNA不能作为完整的单位保留下来。亦未得到 $^{14}\text{N}$  DNA, 这表明所有子代DNA分子都由其母体中获得部分原子。获得的比例必然是一半, 因为杂化DNA区带的密度正好居于 $^{14}\text{N}$  DNA和 $^{15}\text{N}$  DNA密度之间。

繁殖二代以后, 出现了数量相等的两条DNA区带。一是杂化DNA, 另一是 $^{14}\text{N}$  DNA。从这些锐敏的实验中, 梅塞尔森和斯塔尔得出如下结论: “DNA分子中的氮被平均分配在二条连续的亚单位上; 在复制后, 每一子代分子接受了其中一个亚单位; 亚单位在多次重复后仍能保存下来。”他们的结果与沃森-克里克的DNA复制模型非常相符(图24-16)。

## 若干病毒在其生命周期的一部分中出现单链DNA

DNA并不总是双股(链)的。辛希默, R. (Robert Sinsheimer) 发现, 一种能感染大肠杆菌的小病毒 $\phi\text{X174}$ , 其DNA是单链的。这个未预料到的结论是由几个实验导出的。首先,  $\phi\text{X174}$  DNA的碱基比并不符合 $[\text{A}] = [\text{T}]$ 及 $[\text{G}] = [\text{C}]$

的规则。第二,  $\phi\text{X174}$  DNA溶液的粘度比相同浓度的大肠杆菌DNA溶液要低得多。 $\phi\text{X174}$  DNA的流体力学性质与一些随机卷曲的多聚物相似, 而DNA双螺旋的流体力学行为则象一刚性短棒。第三,  $\phi\text{X174}$  DNA碱基上的氨基易与甲醛反应, 而双螺旋DNA上的氨基对甲醛实际上是不可及的。

单股DNA的发现对沃森-克里克所提议的半保留复制机理的普遍性提出了疑问。但随后就发现单股 $\phi\text{X174}$  DNA只在病毒的整个生命周期中一部分时间内出现。辛希默发现, 被感染的大肠杆菌细胞中含有双链形式的 $\phi\text{X174}$  (图24-17)

DNA。此双螺旋DNA被称为复制DNA, 因为它对下代病毒的DNA合成起模板作用。含有单股RNA的病毒, 同样也靠双股复制式进行复制。有关这些过程的详细机理将在第30章讨论。现在重要的是这些研究加强了沃森-克里克模型在复制机理上的普遍意义。双螺旋DNA(或RNA)是所有已知基因的复制形式。

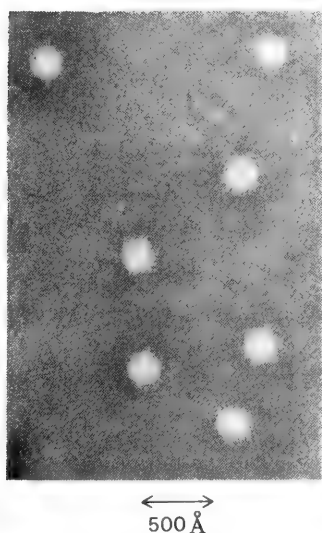


图24-17  $\phi\text{X174}$ 病毒颗粒的电镜图。  
[蒙Dr. Robley Williams  
特许。]

## DNA是很长的分子

在开始讨论其复制机理(一错综复杂的酶过程)之前, 先考虑一下DNA的某些性质。天然存在的DNA分子的一个显著特点是它的长度。大肠杆菌染色体是一个由四百万碱基对组成的双螺旋DNA单分子。此DNA分子的质量是 $2.6 \times 10^6 \text{ kdal}$ 。它的形状高度不对称: 其外廓长度是 $14 \times 10^6 \text{ Å}$ , 而其直径为 $20 \text{ Å}$ 。此DNA分子的外廓长度 $1.4 \text{ mm}$ 相应于大分子的尺寸, 而其宽度 $20 \text{ Å}$ 则为原子尺度。齐姆, B. (Bruno Zimm) 发现, 黑腹果蝇的最大染色体外廓长度为 $2.1 \text{ cm}$ , 是由 $6.2 \times 10^7$ 个碱基对组成的DNA单分子。这样一个高度不对称的DNA



分子极易受剪切力而裂解。在处理这些大分子时必须特别小心，因为它们极易降解成比原来质量小一千倍的碎片。

许多细菌和病毒的DNA分子都已用电子显微镜直接看到（图24-18）。其中一些DNA分子的尺寸列于表24-1。可注意到，即使是最小的DNA分子亦是高度伸长的。例如，多瘤病毒的DNA是由5,100个碱基对组成的，其外廓长度为1.7 $\mu\text{m}$ （17,000 $\text{\AA}$ ）。只要比较一下血红蛋白的直径是65 $\text{\AA}$ ，而胶原蛋白，最长的蛋白质之一，其长度只有3,000 $\text{\AA}$ ，就可深刻认识到DNA分子的惊人长度和不对称性了。

表24-1 DNA 分子的尺寸

生 物	碱 基 对 (以千个为单位, kb)	外廓长度 ( $\mu\text{m}$ )
病毒		
多瘤病毒或SV 40	5.1	1.7
$\lambda$ 噬菌体	48.6	17
T 2噬菌体	166	56
牛痘	190	65
细菌		
支原体	760	260
大肠杆菌	4,000	1,360
真核生物		
酵母	13,500	4,600
果蝇	165,000	56,600
人类	2,900,000	990,000

引自A. Kornberg, *DNA Replication* (W. H. Freeman and Company, 1980), p. 20.

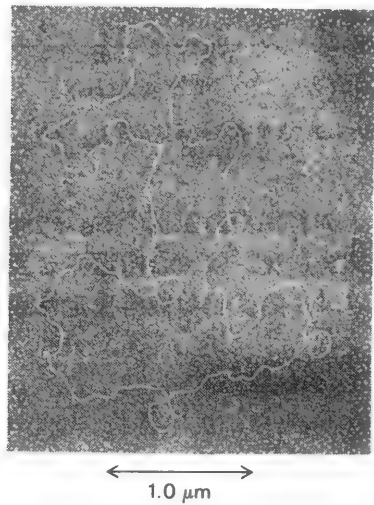


图24-18  $\lambda$  噬菌体 (RF II 型) DNA 分子的电镜图。[蒙Dr. Thomas Broker特许。]

双螺旋能进行可逆性解链

DNA双螺旋的两条链，在配对碱基间的氢键被打断时，很容易分开。这可以通过对DNA溶液加热，或加酸或加碱使其碱基电离而实现。双螺旋的松开（解链）现象称为双螺旋的解链，因为它在温度达某一数值时突然发生。使一半螺旋结构解体所需的温度被定义为解链温度（ $T_m$ ）。这变化发生的突然性表明DNA双螺旋是一高度协作的结构。DNA的解链可用在260nm吸光度的变化方便地监测。碱基对的失重叠使吸光度增加，这一现象称为增色效应（图24-19）。

DNA分子的解链温度与其碱基组成有很大关系。富含GC碱基对的DNA分子的 $T_m$ 比富含AT碱基对的 $T_m$ 高（图24-20）。事实上，很多品系DNA的 $T_m$ 皆与其GC含量有线性关系，即当GC碱基对的份数从20%增到78%时， $T_m$ 从77 $^{\circ}\text{C}$ 上升到100 $^{\circ}\text{C}$ 。GC碱基对比AT碱基对更稳定，因为它们含有三个氢键而AT碱基对只有两个。因此，富含AT碱基对的区域将先解链（图24-21）。以后将讨论到，在体内，DNA双螺旋的解链是通过特异蛋白质的作用，后者有些是通过水解ATP以推动DNA分子解链（455页）。

千碱基（kb）——长度单位，等于双股核酸分子的1,000个碱基对的长度（或一单股分子的1,000个碱基的长度）。  
一个千碱基双股DNA的外廓长度为0.34 $\mu\text{m}$ ，其质量约为660 kdal。

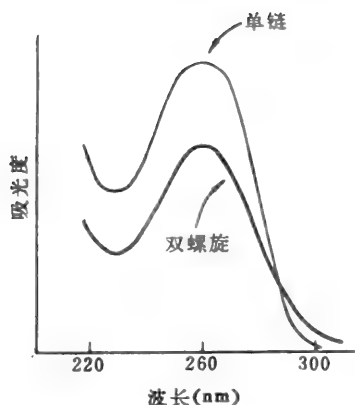


图24-19 当双螺旋解链成单链时，DNA溶液在260 nm的吸光度增加。

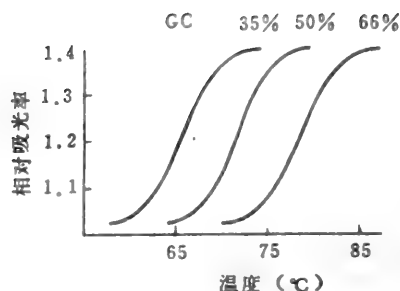


图24-20 DNA解链曲线。用260 nm的吸光度(相对于25℃吸光度)对温度作图。大肠杆菌DNA的 $T_m$ 为69℃(50% G C 对)，绿脓杆菌DNA的 $T_m$ 为76℃(68% G C 对)。

如将温度降至低于 $T_m$ ，分开的DNA互补链将自行重缔合组成双螺旋。这一复性过程有时称为退火。重缔合的速率与互补序列的浓度有关(543页)。双螺旋解链和重缔合的灵便性对DNA的生物功能具决定性意义。

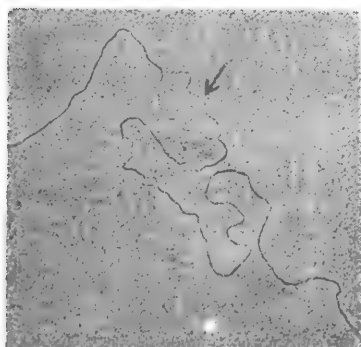


图24-21 被碱部分解链的DNA分子电镜图。单链区成环状，染色比双链段浅。这些解链区中富含A T 碱基对，其中一个用箭头指出，[引自R. B. Inman and M. Schnos, *J. Mol. Biol.* 49 (1970), 93.]

### 某些DNA分子是环状的

电镜技术表明，多种来源的完整DNA是环状分子(见图24-18)。从大肠杆菌的遗传研究中已知此细菌的基因连锁图是环形的，因此可以预料其染色体也是环状的。“环状”是指DNA链的连续性而非其几何形状。在活体内，DNA分子必需采取非常紧密的状态。应注意到大肠杆菌染色体的外廓长度约为细菌本身最大直径的一千倍。

并非所有的DNA分子都具环状。例如，T 7噬菌体的DNA就是线形的；而有些病毒，如 $\lambda$ 噬菌体的DNA分子却可在线形和环形间互变，它在病毒颗粒内是线形，而在宿主细胞内以环形存在(见578页)。

### 环状双螺旋DNA分子可形成超缠绕

线形DNA双螺旋转变成闭环分子时，一个新的性质随之出现。维诺格拉德，J. (Jerome Vinograd)发现，双螺旋的轴本身也会曲绕起来形成一个右手或左手超螺旋(图24-22)。超缠绕、超螺

旋或超蜷曲这几个词的意思是相同的。不具任何超螺旋圈的环状DNA称为松弛分子。将一个松弛DNA分子转变成超缠绕分子需要能量。例如，在SV40 DNA（外廓长度1.7μm）中形成十五圈超螺旋，约需能量100kcal/mol。储存在超螺旋（超绕或超旋）DNA中的张力能约与超旋圈数的平方成正比。

由于两个原因，超绕可能在生物学上有其重要性。第一，超绕DNA在形状上比松弛的更紧密（图24-23）。因此超绕可能对DNA的包装有作用。第二，超绕可影响双螺旋的解链程度从而导致它与其它分子间相互作用的改变。特别是负向超绕会导致双螺旋的解链。饶有兴趣的是看到几乎所有自然界存在的环状DNA分子都是负向超绕的。

闭合环状DNA的一个重要特性是它的联接数（*L*）。联接数的定义是一股围绕另一股所绕的圈数；它必须是一个整数。双螺旋的盘绕程度（*T*）和超绕程度（*W*）有如下的相互关系：

$$L = W + T$$

联接数是个局部（拓扑）性质，仅当DNA的一条链或全部二条链被折断时才发生改变。实际上，催化*L*改变的酶已分离出来了。这些拓扑异构酶的催化作用可简便地用凝胶电泳监测，因为超绕DNA比松弛DNA更紧密，所以移动性也更好（图24-24）。

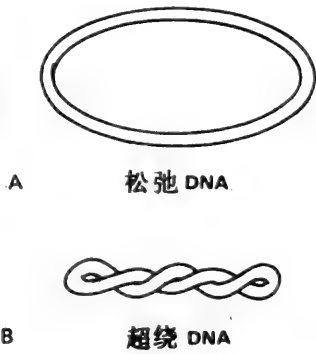


图24-22 (A)松弛DNA，(B)超绕DNA的示意图。

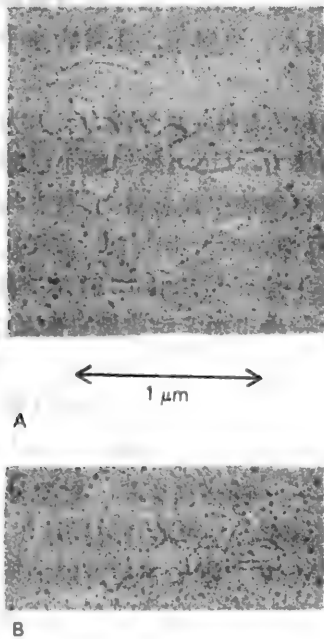


图24-23 线粒体DNA的电镜图：(A)松弛环型；(B)超绕环型。[蒙Dr. David Clayton 特许。]

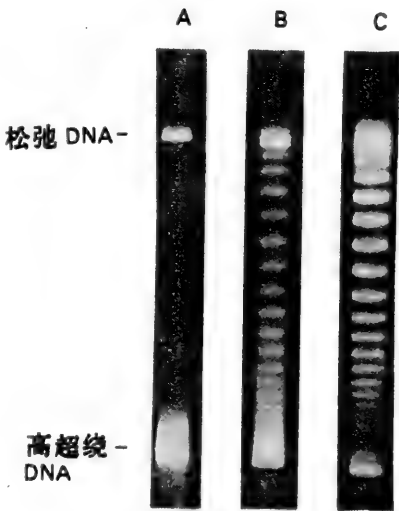


图24-24 凝胶电泳图谱，示超绕SV 40病毒DNA的松弛。A是高度负向超绕DNA；B是加入拓扑异构酶，保温五分钟，C是加入拓扑异构酶，保温三十分种后得出一系列超绕减少的区带图。[引自W. Keller, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72(1975): 2553.]

## DNA聚合酶的发现

现在转向DNA复制中分子过程的讨论。寻找合成DNA的酶的研究是由科恩伯格, A. (Arthur Kornberg) 及其同事们在1955年开始进行的。这项研究不久就证明是富有成效的, 主要由于他们在实验设计中做了三个恰当的选择:

1. 什么是DNA的活化前体? 他们正确地推测脱氧核苷5'-三磷酸(盐)是DNA合成的活化中间体。这个推断来源于二个线索。第一, 嘌呤和嘧啶生物合成的途径导致核苷5'-磷酸而不是核苷3'-磷酸的产生。第二, ATP是合成辅酶和辅酶I (NAD<sup>+</sup>)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和辅酶A (CoA) 中焦磷酸键的活化中间体。

2. DNA合成以什么标准衡量? 可以预计, 在最初实验中DNA合成的净量可能很小, 特别是在核酸酶普遍存在的情况下。因此, 需要一种很灵敏的检测方法。这就是使用放射性前体核苷酸。这些前体掺入DNA的情况可通过测量保温液中酸沉淀物中的放射性加以检查。这项技术的基础是DNA能被三氯乙酸之类的酸所沉淀, 而前体核苷酸则留在溶液中。

3. 应该分析哪一类细胞? 在最初用动物细胞抽提液做实验得到阴性结果后, 就改用大肠杆菌。选择大肠杆菌是因为它二十分钟就能繁殖一代并且得量也大。如所预料, 这种细菌是合成DNA酶的一个最好来源。

将大肠杆菌的抽提物与放射性脱氧胸苷5'-三磷酸一起保温。在此<sup>14</sup>C标记的前体中放射性水平是100万脉冲/分。在培养液的酸沉淀中发现仅有50脉冲/分。仅仅合成了几微微摩尔DNA, 但毕竟有了一个起点。科恩伯格写道: “尽管掺入核酸的核苷酸为量甚少, 但它终究是显著高于本底水平。我们试图在这个微小裂隙中打入一个楔子, 所用的锤子就是酶的纯化, 一个在阐明酒精发酵时就已成熟的技术”。

这个新酶被命名为DNA聚合酶(图24-25); 现在则称为DNA聚合酶I, 因为自那以后又分出其它的DNA聚合酶。经过科恩伯格实验室十年的努力, DNA聚合酶I已被纯化为均一的酶, 它的各种特性也已得到阐明。从100公斤大肠杆菌细胞中只获得500毫克纯酶, 由此可见此工作的艰巨性。

DNA聚合酶I是一个109kdal的单一多肽链。它催化在DNA链上一步加上脱氧核苷酸单位的反应:



DNA聚合酶I需要下列成分以合成DNA的链:

1. 所有四种脱氧核苷5'-三磷酸——dATP, dGTP, dTTP和dCTP——都必须存在。用简写dNTP代表以上各脱氧核苷三磷酸。另外还需要Mg<sup>++</sup>。

2. DNA聚合酶I将脱氧核苷酸加于已存在的DNA(或RNA)链的3'-羟基端上。换言之, 一个有游离3'-羟基的引物链是必要的。

3. 一个DNA模板是必不可少的。模板可以是单链亦可以是双链DNA。只有当双链DNA的糖-磷酸骨架在一处或几处断开时, 双链DNA才是有效的模板。

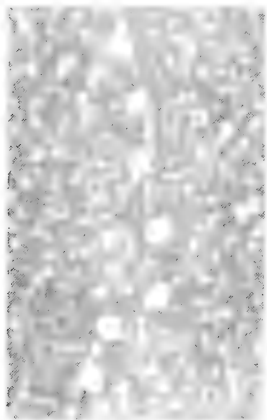


图24-25 电镜图示DNA聚合酶分子(球形)结合于DNA分子上(细线) [蒙Dr. Jack Griffith特许]

由DNA聚合酶催化的链延长反应，是通过引物的3'-羟基末端对加入的脱氧核苷三磷酸中最里面的那个磷原子的亲核攻击而实现的。形成的是一个磷酸二酯键，同时放出一个焦磷酸（图24-26）。焦磷酸的随后水解驱动了聚合反应前进。如果活化中间体是核苷二磷酸的话，全程平衡就不会移向完成。这里就可以看到生物合成反应中活性前体为什么总是以核苷三磷酸

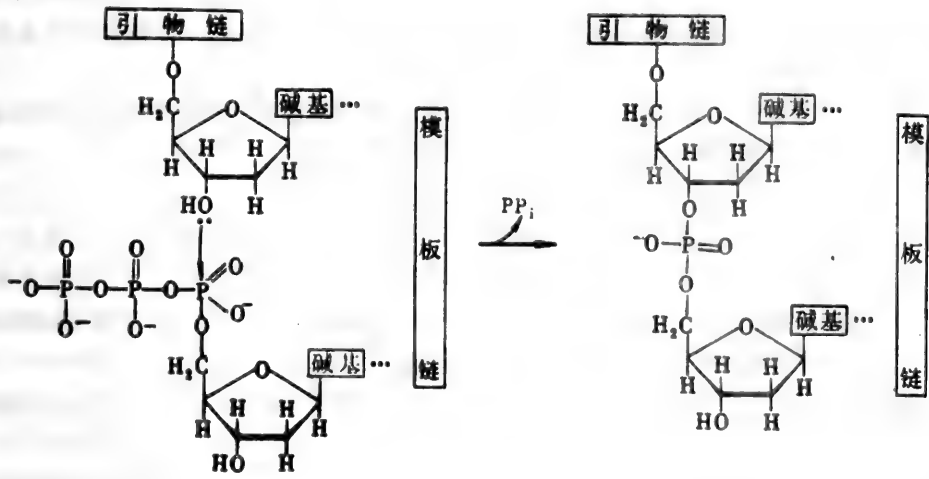


图24-26 DNA聚合酶催化的链延长反应。

酸为多，而不是核苷二磷酸。DNA链的延长是沿5'→3'方向进行的（图24-27）。每分子DNA聚合酶I每秒钟约可催化十个核苷酸被加上去。聚合是连续的，即许多核苷酸可被加上去而酶分子却不从模板上放出。

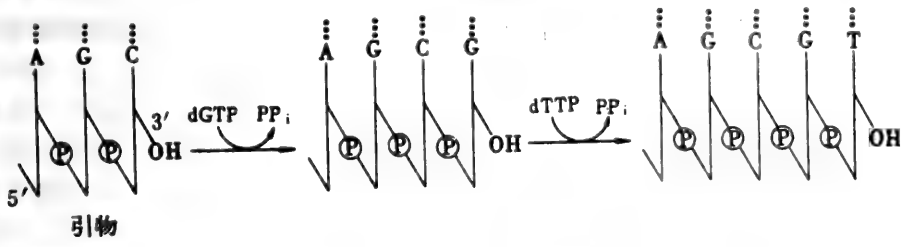


图24-27 DNA聚合酶催化DNA链沿5'→3'方向延长。

### DNA聚合酶接受来自模板的指令

DNA聚合酶只有在进入的核苷酸上的碱基与模板链上的碱基互补时，才能催化磷酸二酯键的形成。除非进入的碱基与模板的碱基能形成沃森-克里克型碱基对，否则共价键形成的可能性是很小的。因此，DNA聚合酶是一种模板指导酶。事实上，它是第一个被发现的这一类型的酶。

几种类型的实验都已证明，DNA聚合酶能从模板上获得指令：

1. 最早的证据是发现，只有当所有四种脱氧核苷三磷酸以及一个DNA模板都存在时，才能见到DNA的合成。

2. DNA聚合酶亦能催化某些碱基类似物的掺入。例如，尿嘧啶或5-溴尿嘧啶能代替胸腺嘧啶。而次黄嘌呤能取代鸟嘌呤。并且取代的方式是高度专一的。其规则是碱基类似物必须能同被它替代的那种碱基的互补碱形成沃森-克里克型碱基对。因此，次黄嘌呤能替代鸟嘌呤（不能替代A、T或C），因为它能同胞嘧啶配成合适的碱基对。

3. 新合成的DNA的碱基组成只与模板的本质有关，而不依赖于四种前体核苷酸的相对比例。产物DNA的碱基组成与双螺旋模板DNA的组成相同。这表明模板DNA的两条链都由DNA聚合酶复制。

4. 最有力的证据是这一个发现：由DNA聚合酶I在体外复制的 $\phi$ X174 DNA具有完全的感染性。因此，此酶工作错误的机率必定是很低的。

### DNA聚合酶I改正DNA中的错误

DNA聚合酶的另一种酶学性质是在某种条件下还能水解DNA链。它能将DNA链从3'-羟基末端开始逐个进行水解。产物是单核苷酸。因此，DNA聚合酶I是一个3'→5'核酸外切酶(图24-28)。被切去的核苷酸必须有一个自由3'-羟基末端，并且不能是双螺旋中的一部分。这种外切核酸酶活性究竟是DNA聚合酶的一种有害副作用，或者是有助于DNA聚合酶的生物学作用呢？人们利用化学合成的多聚核苷酸做了实验，在此合成的引物末端有一错配的残基。实验表明，3'→5'核酸酶活性在合成过程中起一种编辑的作用。考虑图24-28所示的多聚体，其中一个dT残基序列同另一较长的dA高聚物形成了双螺旋。在这个多聚dT序列的3'末端，有一个单独的dC残基，此残基未形成氢键，因为它同dA不是互补的。在加入DNA聚合酶和dTTP后，这个错配的dC残基先被水解下来，然后dT被加接上去。用各种合成多聚物所做的实验都表明，DNA聚合酶I总是先除去引物末端上的错配残基，然后再进行DNA聚合作用。如果末端配对适当并且有活化前体存在，那么仅有极少，甚至没有水解发生。聚合能防止3'端的水解。

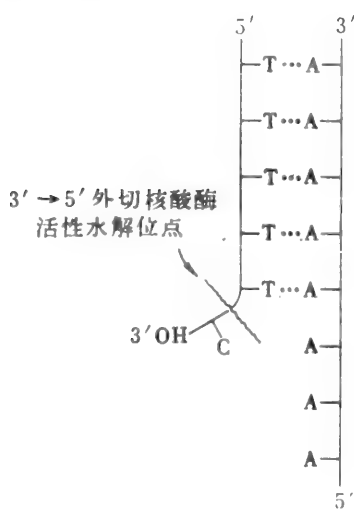


图24-28 DNA聚合酶I的3'→5'外切核酸酶作用。

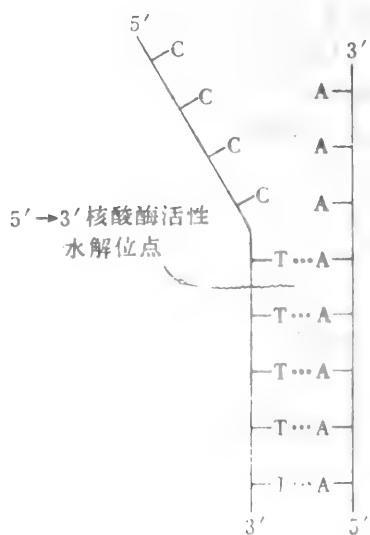


图24-29 DNA聚合酶I的5'→3'核酸酶作用。

DNA的复制可能是非常精确的，因为每对碱基都经二次核对。聚合通常不会发生除非碱基对能容纳于双螺旋中。但如果在此阶段发生错误，那么在下个核苷酸被加接之前会得到校正。实际上DNA聚合酶在进行下一步之前，都要对其催化的每步结果加以核对。

DNA聚合酶 I 也可以从链的 5' 端对DNA进行水解。这种5'→3'核酸酶活性(图24-29)同上述3'→5'外切核酸酶的作用截然不同。首先，被切断的键必在双螺旋区域内。其次，断键可以发生在末端的磷酸二酯键上，或是在距5'末端几个残基以外的键上(5'端可以带自由的羟基，也可是磷酸化的)。第三，5'→3'核酸酶活性可由伴随的DNA合成而加强。第四，5'→3'核酸酶作用的活性位点与聚合及3'→5'水解作用的活性位点明确地分开。蛋白酶能将DNA聚合酶 I 裂解成一个36kdal的片段和一个75kdal的片段。前一片段具有全部原有的5'→3'核酸酶活性，而后一片段保有聚合酶及3'→5'外切核酸酶的全部活性。因此，在DNA聚合酶 I 这一条多肽链上含有至少两种不同的酶。5'→3'外切核酸酶能校正另一种类型的错误，从而补充3'→5'外切核酸酶的作用。例如，5'→3'核酸酶参与切除嘧啶二聚物，后者在DNA受到紫外线照射时形成(见 457 页)。此外，5'→3'核酸酶活性对复制过程本身也有关键性作用( 453 页)。

### DNA连接酶连接DNA片段

DNA聚合酶 I 能将脱氧核糖核苷酸加到引物DNA链上，但它不能催化两条DNA链的接合或单条DNA链的闭合。环状DNA的发现使人们确信这种酶一定存在。1967年，几个实验室的研究人员同时发现了DNA连接酶，这种酶催化两条DNA链之间结合形成磷酸二酯键(图24-30)。酶作用要求一条DNA链的3'端有自由羟基而另一条DNA链的5'端有一磷酸基团。在这两基团间形成磷酸二酯键是一个吸能反应。因此，连接反应需要一个能源。在大肠杆菌及其它一些细菌中，NAD<sup>+</sup>起能源作用；而在动物细胞和噬菌体中，反应由ATP驱动。

DNA连接酶的另一特点也应予以注意。DNA连接酶不能将两个单股DNA分子连接起来；它所能连接的只是作为双螺旋一部分的DNA链。对模型系统的研究提示：只有当成键区内至少有几个碱基对存在时，DNA连接酶才能催成一个磷酸二酯桥。实际上，DNA连接酶是使双螺旋骨架上的缺口闭合。这个接合过程对正常的DNA合成、修补受损的DNA以及基因重组中的DNA链的拼接，都是必不可少的。

下面看一下由莱曼I. R. (I. Robert Lehman) 所阐明的这个过程的机理。ATP或NAD<sup>+</sup>先与DNA连接酶反应，生成一个共价的酶-AMP复合物，其中AMP与酶分子中赖氨酸的ε-氨基通过一个磷酸酰胺键连在一起(图24-31)。AMP部分使DNA的5'端的磷酸基团活化。最后

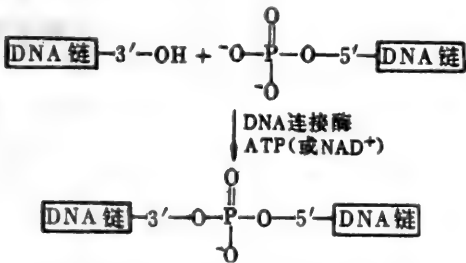


图24-30 DNA连接酶催化两条DNA链(皆双螺旋分子的一部分)的连接。

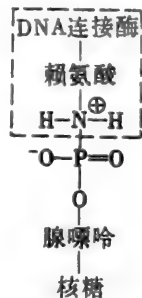


图24-31 共价结合的酶-AMP中间体。

的步骤是3'-OH基对此活化磷原子进行亲核攻击,结果形成了一个磷酸二酯键并放出一个AMP。这一序列的反应是由形成酶-腺苷酸复合物时释出的焦磷酸的水解所推动的。因此,若以ATP为能源,则形成一个DNA骨架上的磷酸二酯键就要消耗两个高能磷酸键(图24-32)。

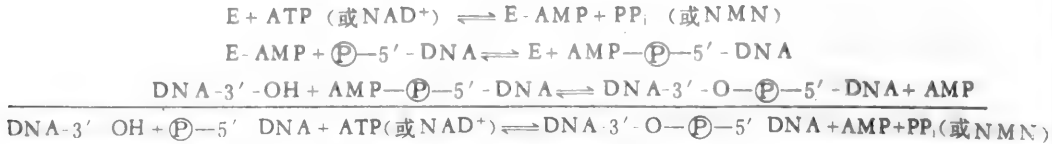


图24-32 DNA连接酶催化反应的机理。

### DNA聚合酶Ⅱ和聚合酶Ⅲ的发现

上述指出DNA聚合酶Ⅰ能在体外合成和修补DNA。在体内,它能否执行这些功能?这是一个有意义的问题,因为酶在体外执行的功能不一定能在体内执行。细胞内的反应条件可能会不同,同时还会有其它酶存在。事实上,大肠杆菌确实含有至少两种其它DNA聚合酶,即聚合酶Ⅱ及聚合酶Ⅲ,它们在发现DNA聚合酶Ⅰ以后十五年才被找到。为什么拖了如此之久?因为聚合酶Ⅰ的高度活性掩盖了Ⅱ及Ⅲ的存在。

1969年出现突破。德卢西亚, P. (Paula DeLucia) 和凯恩斯, J. (John Cairns) 分离出了一种大肠杆菌突变株,其抽提液中DNA聚合酶Ⅰ的聚合活性仅为正常值的0.5%至1.0%。此变种(称polA 1)的繁殖速率却与亲代株相同。而且,多种噬菌体在polA 1中复制的能力也与在亲代株不相上下。所不同的是变种较其亲代株易受紫外线杀伤。同时, pol A1对甲基磺酸这种化学诱变剂的致死效应也更为敏感。德卢西亚和凯恩斯推断,在polA 1突变株中,DNA的复制正常,但DNA的修补显著受损。他们提出,催化DNA的合成可能需要另一种与DNA聚合酶Ⅰ不同的聚合酶。

由于polA 1突变株中聚合酶Ⅰ含量很低,这就促成了新DNA聚合酶的发现。不久,两类酶就在几个实验室中得到分离与鉴别。DNA聚合酶Ⅱ和Ⅲ与聚合酶Ⅰ在下列几个方面是相似的:

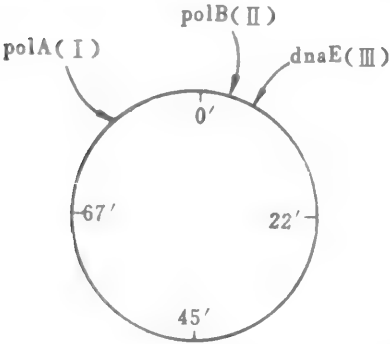


图24-33 大肠杆菌三种DNA聚合酶的结构基因位置图。DNA聚合酶Ⅰ处于polA位点,聚合酶Ⅱ处于polB位点,Ⅲ处于dnaE位点。

1. 催化在模板指导下从脱氧核糖核苷三磷酸前体合成DNA。

2. 需要一个有自由3'-OH基的引物。

3. 沿5'→3'方向进行合成。

4. 具3'→5'外切核酸酶活性。DNA聚合酶Ⅲ同时是5'→3'外切核酸酶,但聚合酶Ⅱ不是。

这些聚合酶在对模板的选择性上有所不同。聚合酶Ⅱ和Ⅲ对具有短裂隙的DNA双螺旋模板作用最佳,而聚合酶Ⅰ则适合于在双螺旋区域附近有大段单股区的模板。在体外,这些聚合酶的最大催化速率也不同:聚合酶Ⅰ每秒钟能加合10个核苷酸,聚合酶Ⅱ每秒0.5个,聚合酶Ⅲ每秒150个。DNA聚合酶Ⅲ处于生理活性状态时



是与若干其它蛋白质缔合存在。这种多亚基复合体称为**DNA聚合酶Ⅲ全酶**。

在活体中，这些聚合酶有何作用？我们即将讨论到，含有聚合酶Ⅲ的多酶复合体能合成大多数新DNA，而聚合酶Ⅰ则负责消除引物并填满间隙。DNA聚合酶Ⅱ的作用则尚未明了。近来的生物化学及遗传研究表明，大肠杆菌的DNA复制，除需要DNA聚合酶Ⅰ、Ⅲ，DNA连接酶外，还要求十多个蛋白质。在转向讨论这些蛋白质同DNA之间的相互作用前，首先看一下在整个染色体水平上的DNA复制。

### 亲代DNA解链和新DNA在复制叉上合成

依靠放射自显影术和电镜技术，已能看到在复制过程中的DNA。在放射自显影术中，利用合适的放射性同位素（例如氘）的衰变来形成图象。发射出的电子作用于照相乳胶中的银粒子；胶片冲洗后就显出一个个黑点。放射自显影术的分辨率较低，约为几百埃。然而，这个技术具有吸引力，因为显出来的只是经标记的东西。由于氘化胸腺嘧啶或胸苷的掺入，用自显影术可见到DNA的实况。

放射自显影术和电镜技术都显示，复制中的大肠杆菌DNA是一个有内圈的闭合环状体（图24-34）。这种形式称为 $\theta$ 结构，因为它与这一希腊字母相象。 $\theta$



图24-35 复制中的大肠杆菌环形染色体示意图。 $\theta$ 结构的实线股代表亲代DNA，虚线代表新合成的DNA。

结构表明在**DNA复制**时仍保持一个环状形式。这种技术的分辨率还不足以显示自由末端。然而，可清楚地看到长段的单股DNA是不存在的。因而这些图象可完全否定认为合成新DNA时，亲代DNA必须全部解开才能充当复

制模板的复制机理。相反，现认为机理是：**新DNA的合成与亲代DNA的解链密切偶联**；在一个部位同时进行着解链和合成，此部位称为复制叉。

### DNA复制开始于独特原点 并顺序地沿相反方向进行

大肠杆菌中DNA的复制是从染色体的任意部位开始，还是有一个特定的起始部位？由于DNA复制是一个严格控制的过程，因此从特定起始部位开始的可



图24-34 复制中大肠杆菌DNA的放射自显影图。[蒙Dr. John Cairns特许。]

能性更大一些。DNA在快速合成条件下时，对不同基因相对量的研究表明，大肠杆菌中DNA的复制始于一个独特的原点。考虑*a*和*b*两个基因，假定*a*位于复制起点附近而*b*位于近终点，那么*a*基因的复制将远远领先于*b*。在一个快速生长的培养中就会出现近乎有两个*a*基因才

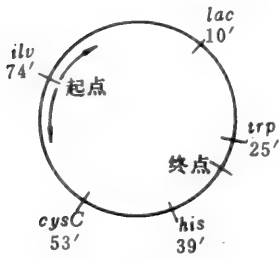
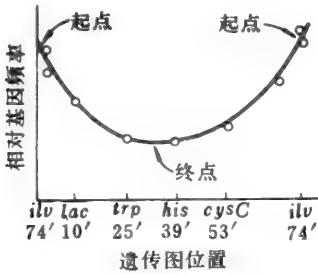


图24-36 在大肠杆菌中，DNA快速合成条件下，不同基因的相对数量与其在遗传图中的位置之间关系。

有一个*b*的情况。相反，如DNA复制的起点是随机的，则*a*与*b*的量应相等。人们利用杂交技术（这种技术将在后面讨论，468页）测定了若干基因的相对频率。这类实验结果清楚地表明相对基因频率确实与其图上位置有关（图24-36）。这些数据表明：

1. 复制起始于一个特定的，靠近*ilv*基因的部位，这基因位于大肠杆菌标准遗传图的74'处。
2. 复制是以相同的速率向两个相反方向同时进行的。换言之，即有两个复制叉，一个顺时针移动，另一个反时针移动。
3. 两个复制叉在近*trp*基因（遗传图中25'）处会合；这会合点正好是通过起点的直径与环相交的一点。

放射自显影术也为大肠杆菌DNA的双向复制提供了证据。人们将细菌放在含中等放射强度的氟化胸腺嘧啶介质中开始进行复制。培育几分钟后，将细菌转入一个含强放射性的氟化胸腺嘧啶介质中。用两个不同强度的放射水平使自显影后现出两类不同的点迹：低密度的点迹示最初合成的DNA，高密度的点迹相应于后来合成的DNA。如果复制是单方向的，则会看到一端是低密度点迹而另一端是高密度点迹。相反，

如果复制是双向的，则中段的点迹应是低密度的（图24-37）。放射自显影图（图24-38）给出了鲜明的答案：所有两端的点迹密度都高于中间点迹，这说明大肠杆菌染色体的复制是双向的。

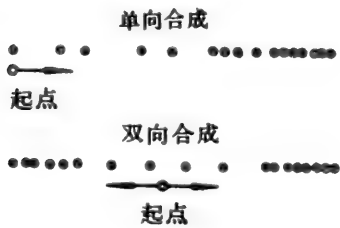


图24-37 当细菌从中等放射强度介质转移至强放射介质中后，预期应得的单向和双向复制的放射自显影图。



图24-38 复制期间大肠杆菌DNA的放射自显影图（复制条件如图24-37）。图中点迹表明复制是双向的。[引自D.M. Prescott and P. L. Kuempel, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69 (1972): 2842.]

### DNA中的一股是间断性合成的

现在回到复制中分子间相互作用的讨论。在一个复制叉上，亲代DNA的两股（链）皆是新DNA合成的模板。已知亲代DNA的两链是反平行的。故DNA合成的整体方向似应该一

个子代DNA链是 $5' \rightarrow 3'$ ，而另一子代DNA链为 $3' \rightarrow 5'$ （图24-39）。但所有已知的DNA聚合酶合成DNA均为 $5' \rightarrow 3'$ 方向而不是 $3' \rightarrow 5'$ 方向。那么为什么子代DNA中的一股在低分辨率下看上去是沿 $3' \rightarrow 5'$ 方向生长呢？

冈崎，R. (Reiji Okazaki) 解决了这个难题。他发现新合成DNA中大部分以小段形式存在。这种约含一千个核苷酸的单位（称为冈崎片段）短暂地存在于复制叉的周围。随着复制进行，这些片段通过DNA连接酶共价接合成一条子代DNA链（图24-40）。另外一股则是连续或近乎连续地合成的。从冈崎片段合成的这股称为随从链而以连续或接近连续方式生成的新股称为领头链。冈崎片段和领头链两者皆以 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成。随从链的不连续装配使原子水平的 $5' \rightarrow 3'$ 聚合表现为 $3' \rightarrow 5'$ 方向的生长。

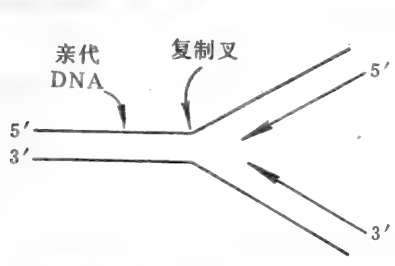


图24-39 在低分辨率条件下，DNA复制的表现方向在一股子代DNA是 $5' \rightarrow 3'$ ，在另一股则为 $3' \rightarrow 5'$ 。实际上，两股都以 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成，如图24-40所示。

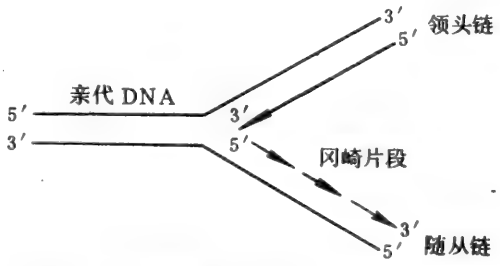


图24-40 复制叉示意图。两股DNA都以 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成。领头链的合成是连续的，而随从链则以短段形式（冈崎片段）合成。

## DNA合成由RNA引发

DNA的合成怎样开始？已提到过，所有的DNA聚合酶都要求一个有自由 $3' - OH$ 的引物来发动DNA合成。合成领头链和冈崎片段的引物是什么？一个重要的线索是观察到：DNA合成的开始以RNA合成成为必要前提。这个发现提示，RNA可能是引发DNA合成的引物，因为已知RNA聚合酶能启动链的新合成。随后又证明新生DNA与一短段RNA以共价联在一起，后者实际上就是一个引物。因此是RNA引发了DNA的合成。

大肠杆菌中的DNA复制可能按以下步骤进行：

1. 一种特异的RNA聚合酶（称为引物酶）合成一短段与DNA中一模板链互补的RNA（约十个核苷酸）。引物酶与DNA聚合酶不同，不需引物来引发多核苷酸的合成。
2. 此RNA链的末端核苷酸的 $3' - 羟基$ 作为引物引发DNA聚合酶Ⅲ全酶进行新DNA的合成。多数新DNA都是由这种多亚基复合物合成的。
3. 然后这RNA-DNA杂化物的RNA部分被DNA聚合酶Ⅰ所水解。
4. 从新生链上除去RNA后使DNA片段间出现相当量的裂隙。这些裂隙由DNA聚合酶Ⅰ所弥合。此酶是善于根据单链模板的指令进行DNA合成的。

最近的研究表明，在引物酶作用之前还有至少由五种蛋白质组成的预引发中间体的形成。五种蛋白质之一称dnaB蛋白，它通过水解ATP推动自身沿DNA前进。dnaB蛋白可能在活化引物酶方面是一个识别信号。至于特异引发一轮复制这一性质则可能存在于能将dnaB正确地

引到*ilv*位的一些蛋白质中；我们记得*ilv*是大肠杆菌染色体的复制原点 DNA复制的时间安排是很关键的，因为它必需同细胞分裂协调起来。确实看到细菌染色体与细胞膜的内折连在一起(图24-42)。

图24-41 DNA合成的起始：(A) 引物酶合成一段短互补RNA；(B) 此RNA作为新合成DNA的引物；(C) 新链的RNA部分被水解，留下一个裂隙，随后被填满。

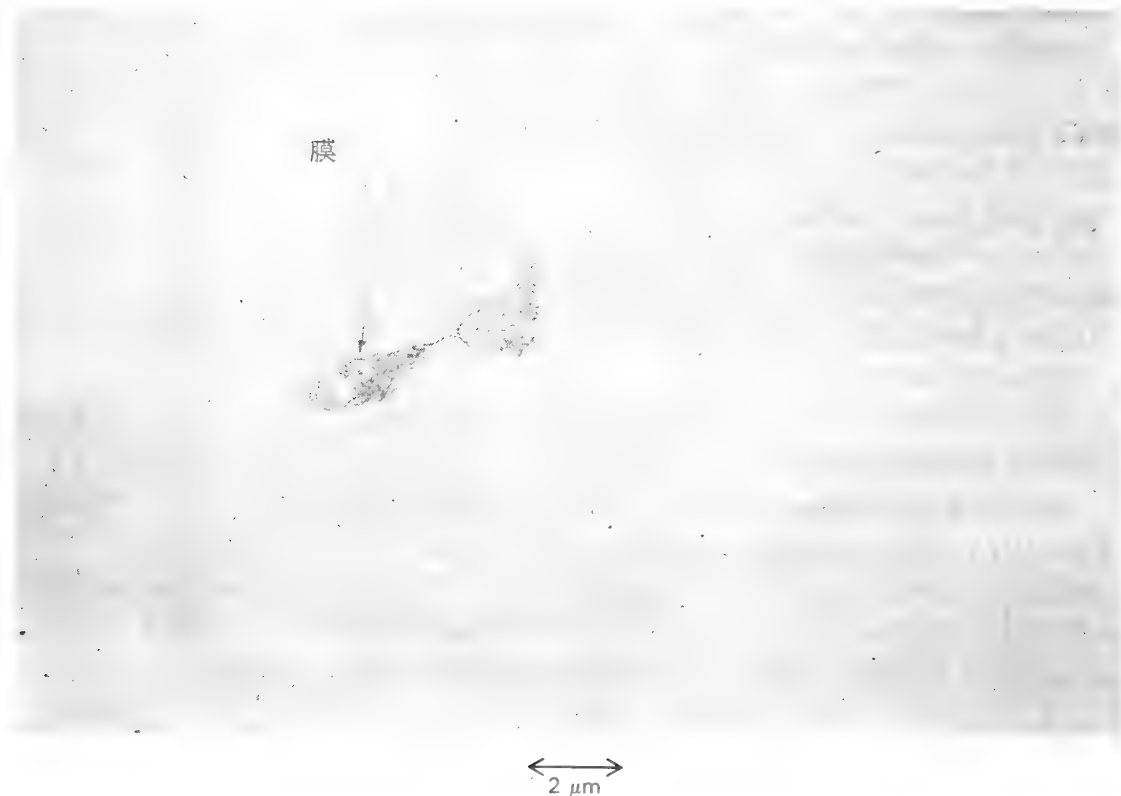
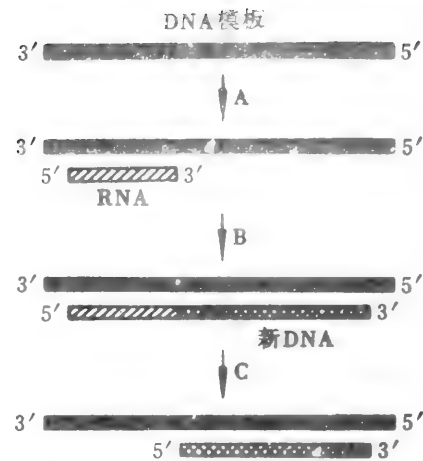


图24-42 附着在两个细胞膜碎片上的大肠杆菌染色体电镜图。示单分子DNA双螺旋，分子完整，呈超螺旋状。[引自H. Delius and A. Worcel, *J. Mol. Biol.* 82(1974): 108.]

### ATP的水解推动复制叉上的亲代DNA 在REP蛋白作用下解链

1953年，沃森和克里克提到“链的解开极为困难”。但最近的研究表明，大肠杆菌中亲代DNA双螺旋在复制叉上被称为REP蛋白的酶轻巧地松开。亲代DNA的松开（或解链）由

ATP水解提供动力，因而REP蛋白是一个解链酶。分开一个碱基对约需消耗二个ATP。被分开的每一亲代DNA单链就同几分子单链DNA结合蛋白（SS-结合蛋白）相互作用。SS-结合蛋白起稳定作用，使由解链酶作用下形成的单链DNA稳定，于是解链区才能完成模板作用。SS-结合蛋白又称为螺旋去稳定（HD），或解链蛋白。

DNA旋转酶将反向超卷曲泵入  
亲代DNA，从而促进解链

在闭环DNA的解曲中出现了一个拓扑学问题。确切地说，在一闭合分子中，双螺旋的解曲导致正向超卷曲的形成。在复制叉上的亲代DNA旋转很快，速率为每秒100转，这比唱片机的转速快100倍。如要解链继续进行，就需将这种旋转所致的正向超卷曲松开。换言之，即需一个分子旋转器。盖勒特，M. (Martin Gellert) 近来发现，这一功能由DNA旋转酶完成。这种拓扑异构酶通过切断与封闭DNA骨架上的磷酸二酯键而解开正向超卷曲。催化这个DNA三级结构的松弛不需ATP，因为在热力学上是有利的。此外，DNA旋转酶能通过ATP的水解活跃地向闭环状DNA输入反向超卷曲（图24-43）。这些反向超卷曲促进了亲代DNA在复制叉上的分离解链。

复制机构的复杂性可  
能是保证高度准确性所必需

现将当前了解的大肠杆菌DNA复制的分子过程总结于图24-44及表24-2。这个过程的一个显著特点是多种蛋白质之间的错综复杂的相互作用。遗传分析表明，至少有十五种蛋白质直接参与DNA的复制。为什么DNA的复制会如此复杂？特别是为何DNA的合成要有一个RNA引物来引发，而随后这个引发物又被消除？如果DNA聚合酶能开始链的新合成，则RNA引物就无必要了。然而，这样的性质就将与DNA聚合酶的高度忠实性不相容了。我们记得DNA聚合酶在开始形成一个新磷酸二酯键前，总先检查前一个碱基对是否正确。这种校对功能极大地减少了出错的几率。相反，RNA聚合酶能引发新链合成因为它们不对前一个碱基对进行检查。因此，它们的出错率比DNA聚合酶要高几个数量级。这样，逐步产生了一个巧妙的解决办法：即以一段低忠实性的多核苷酸来开始DNA的合成，但是以核糖核苷酸来标志其“暂时的”性质。这些短RNA引物序列随即为DNA聚合酶I所切除，并以高忠实性的DNA序列取代之。这种对精确性的高度要求可能就造成了DNA复制的复杂性。遗传分析表明，复制误差率仅为十亿分之一至



图24-43 DNA旋转酶的催化作用。

百亿分之一，即每复制十亿到一百亿个碱基对才会出一个差错。

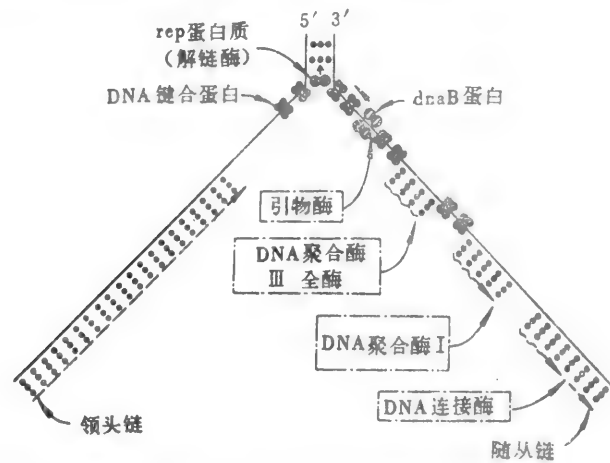


图24-44 大肠杆菌复制叉上酶反应的示意图。方框内为酶催化链的起始、延长和连接。[依据DNA Replication by A. Kornberg, W. H. Freeman and Company. Copyright © 1980.]

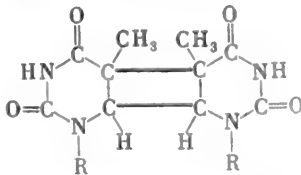
表24-2 大肠杆菌的复制蛋白质

蛋 白 质	作 用	大小 (kda)	每个细胞中的分子数
dnaB 蛋白	使引物酶开始反应	~ 250	20
引 物 酶	合成RNA引物	60	100
rep 蛋白	解开双螺旋	65	50
SS键合蛋白	稳定单链区	74	300
DNA 旋转酶	导入超绕螺旋	400	—
DNA 聚合酶 III 全酶	合成DNA	> 300	20
DNA 聚合酶 I	消除引物, 填满裂隙	109	300
DNA 连接酶	连接DNA末端	74	300

### DNA 的损伤不断得到修复

多种化学和物理因素都能损伤DNA，因此各种细胞皆有修补损伤的机能。碱基可能遭受改变或丢失，骨架中的磷酸二酯键可能断裂，螺旋链间可能形成交联。引致这类损伤的可能是离子辐射，紫外线和各种化学物质。DNA遭受的损伤大部可被修复，因为遗传信息是储存在双螺旋的两链上，一链所丧失的信息可从另一链上收回。

最为人们理解的修复机理之一是嘧啶二聚体的切除。此二聚体是DNA在紫外线作用下生



胸腺嘧啶二聚体

成的（图24-45）。此时一条DNA链上的相邻嘧啶残基间形成共价连结。此种嘧啶二聚体不能容纳于双螺旋结构中。不将二聚体除去，复制和基因表达就会受到阻碍。这一修复过程需要四种酶参加作用（图24-46）。首先，由一个紫外线特异性的核酸内切酶发觉畸变区，并在这二聚物附近将链切断，通常是在5'端。然后含二聚物的片段脱开，使DNA聚合酶 I（或相类似的聚合酶）得以沿5'→3'方向进行修复合成。合成时的引物是此断链的3'端，模板则是那完好的互补链。接着，嘧啶二聚物区经DNA聚合酶的5'→3'外切酶活性作用而割除。最后，新合成的DNA片段和原

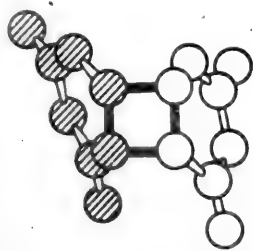


图24-45 紫外照射产生的尿嘧啶二聚体模型。胸腺嘧啶二聚体也有近似的结构。

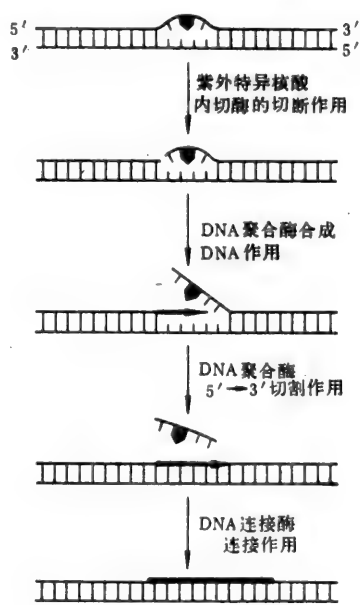


图24-46 DNA中含胸腺嘧啶二聚体区的修复。通过特异核酸内切酶，DNA聚合酶及DNA连接酶的顺序作用。胸腺嘧啶二聚体用黑色块表示，新DNA区用粗线表示。[依据P. C. Hanawalt, *Endeavor* 31 (1972): 83.]

存的DNA部分通过连接酶作用被连接起来。另一可能是，嘧啶二聚物靠光化学过程得到复原。几乎所有细胞都含一种光活化酶，它在吸收蓝光的情况下识别二聚物，并将其割开恢复为原来的碱基。

### DNA修复作用的缺陷导致着色性干皮病\*及皮肤癌

着色性干皮病是一种人类的罕见皮肤病，具常染色体隐性遗传特征。有病的纯合子病人的皮肤对阳光或紫外线极为敏感。在婴儿期，严重的皮肤病变已很明显并日趋恶化。皮肤干燥，真皮萎缩。角化病出现，眼睑呈现疤痕，角膜出现溃疡。皮肤癌通常在多处可见。由于恶化皮肤肿瘤的转移，许多患者不满三十岁就死亡。

紫外线在人体DNA中，如在大肠杆菌DNA中一样，导致嘧啶二聚体产生。修复机理看来亦相似。对着色性干皮病患者皮肤成纤维细胞的研究揭示，有一类型的干皮病有一种生化缺陷。在正常的成纤维细胞中，由紫外照射形成的嘧啶二聚物的半数在不到二十四小时内被割除。而在着色性干皮病患者的成纤维细胞中，在同一时间内二聚物的割除几乎等于零。修复的哪一步受到阻碍呢？人们对经紫外照射的成纤维细胞中DNA链分子量的研究结果提供了答案。正常细胞经紫外照射后几小时内，其中的单链DNA的分子量就会显著变小。这种

\* 干皮病——源于希腊词干皮。此词于1874年首次由赫布拉，F. (F. Hebra) 及卡波西，M. (M. Kaposi) 提出，用以描述一病人的“羊皮纸皮肤”及异常着色。

分子量的减小是由修复过程的第一步引起，即嘧啶二聚物附近DNA链的断裂造成的。在照射后的着色性干皮病细胞中却显不出这种分子量的减小。因此，这种皮肤病可能由于催化嘧啶二聚物附近DNA骨架水解的内切核酸酶缺陷引起的。这种酶缺陷导致的严重临床后果充分说明DNA修复过程的重要意义。

### 含胸腺嘧啶而非尿嘧啶的DNA能进行脱氨基胞嘧啶的修复

DNA中的胞嘧啶以可觉察的速度自发地脱去氨基形成尿嘧啶。胞嘧啶的脱氨基具潜在的诱变性，因为尿嘧啶与腺嘌呤配对，使一条子代链上含有Au碱基对，取代了原来的GC碱基对。



这种变异由一个能识别外来的尿嘧啶的修复系统予以防止（图24-47）。首先，一个尿嘧啶-DNA糖苷酶



**DNA糖苷酶**将尿嘧啶和脱氧核糖之间的糖苷键水解。在这一步，DNA骨架不受损害，仅丢失了一个碱基。其后，一特异内切核酸酶识别这种缺陷，就将丢失碱基附近的DNA骨架切断。DNA聚合酶I再在完好的互补链上的鸟嘌呤影响下，割除残余的脱氧核糖磷酸单位并插入一个胞嘧啶。最后，修复的链由DNA连接酶接合起来。

为什么DNA中存在胸腺嘧啶而非尿嘧啶，很多年来都是个谜。这两个碱基都与腺嘌呤配对，它们之间仅有的不同是尿嘧啶C-5上是一个氢而胸腺嘧啶C-5上为一甲基。为何甲基化的碱基用在DNA中而不在RNA中？应记得脱氧尿苷酸甲基化形成脱氧胸苷酸是一个耗能很大的反应（407页）。近来发现的这个纠正胞嘧啶脱氨基的修复系统，给这个使人迷惑不解的问题提出了一个令人信服的解答。尿嘧啶-DNA糖苷酶不能从DNA中除去胸腺嘧啶。因此，胸腺嘧啶中的甲基是一个将它与去氨基胞嘧啶区别的标志。如缺少这个标志，则在正确位置上的尿嘧啶就不能与脱氨基形成的尿嘧啶区别开来。这一缺陷就会被忽略而保存下来，从而使一个GC碱基对在其一个子代DNA分子中突变为Au。这种突变现由一个能搜寻尿嘧啶而放过胸腺嘧啶的修复系统来防止。在DNA中使用胸腺嘧啶（而不是尿嘧啶）可能是用以加强遗传信使的忠实性。相反，RNA是不修复的，因此尿嘧啶可作为不昂贵的用以构造RNA的构造元件。

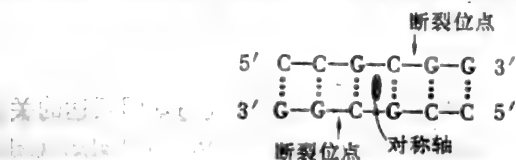
图24-47 DNA中的尿嘧啶残基被割除，并由原碱基胞嘧啶置换。



## 限制性核酸内切酶使DNA的分析革命化

限制酶是核酸内切酶，能识别DNA双螺旋中特异的碱基顺序并裂解两股螺旋。这些优美精确的解剖刀是自然界赠给生物化学家的一种绝妙礼物。限制性酶使仅几年前尚梦想不到的实验方法成为可能。在分析染色体的结构，测定长DNA分子的顺序，分离基因以及创造能被克隆的新DNA分子等工作中，它们都是必不可少的工具。这些发展是由阿尔伯，W. (Werner Arber)，史密斯，H. (Hamilton Smith) 和内森斯，D. (Daniel Nathans) 开创的。

多种原核生物中都含有限制性核酸内切酶。它们的生物功能是裂解外来DNA分子。细胞本身的DNA不受降解，因为限制酶所识别的部位皆甲基化了。限制与修饰之间的相互作用将在后面章中讨论（573页）。这里考虑的重要一点是：许多限制性内切酶皆识别四至六个碱基对组成的特异序列，并使此区域中各链的一个磷酸二酯键水解。这些断裂位点的一个显著特点是：它们都具二重旋转对称性。或者说，碱基对的顺序是正反同读的\*。断裂位点对此二重轴来讲是对称分布的。例如，由无色链霉菌中获得的限制酶所识别的顺序是这种内



切酶切断每一链上对称轴外边的CG间磷酸二酯键。已经纯化并鉴定了八十余种限制性内切酶。它们的命名是取自其宿主生物名的三个字母缩写（如大肠杆菌的用Eco，嗜血流感菌用



图24-48 某些限制性核酸内切酶的特异性。这类酶识别的碱基对序列皆含二重对称轴。此区中的两股链沿更点标出的轴，按旋转180°相互对应。断裂位点用箭头表示。每种限制酶的缩写名标于其识别序列之右。

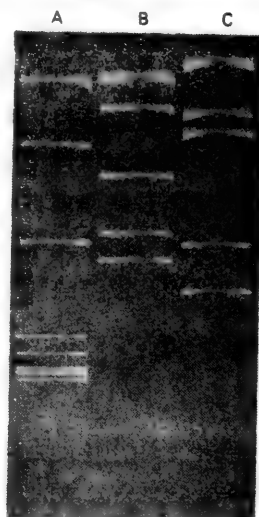


图24-49 分别用三种不同限制酶切割SV40 DNA所产生的片段的凝胶电泳图。凝胶用溴化乙锭荧光染色。[蒙Dr. Jeffrey Sklar 特许。]

\* 正反同读 (Palindrome) —— 一个词、句或诗，无论从右到左或从左到右读，结果一致。由希腊词 Palindromos 来，意思是重新回转。

Hin, 埃氏嗜血菌的用Hae)后面再跟以株名和罗马数字。几种内切酶的特异性示于图24-48。注意键的切割可以是错开,也可以是对齐的。

可用限制性内切酶将DNA分子断裂成特异的,比原分子易于分析或操作的片段。例如5.1 kdal的SV40病毒DNA环状双螺旋能被EcoRI在一个位点,被Hpa在四个位点,被Hind在十一个位点切断。由一种限制酶作用产生的DNA片段可被另一种限制酶再切成更小的片段。使用一系列限制酶可以求得染色体图谱(595页)。另外,限制性片段图谱可以作为DNA分子的“指纹”。有关DNA分子间的微小差别也能容易地检出,因为限制性片段可用凝胶电泳来分离和显现。对一特定凝胶而言,一种DNA片段的电泳迁移率,在一定限度内与其碱基对数目的对数成反比。聚丙烯酰胺凝胶可用以分离含多达一千碱基对的DNA片段,而更疏松的琼脂糖凝胶可用来分辨更大的分子。通过放射自显影可观察放射性DNA的区带。另一方法是将凝胶用溴化乙锭染色,此染料在与双螺旋DNA结合后发出强烈橙色荧光。含有五十纳克DNA的区带可以容易地看到(图24-49)。这些凝胶的另一重要特点是其高分辨能力。

### 特异化学裂解法能快速测定DNA顺序

DNA分子顺序测定技术的有力发展使DNA结构分析及其与基因表达的关系等工作得到极大的便利。马克赛姆, A. (Allan Maxam) 和吉尔伯特, W. (Walter Gilbert) 所开创的化学裂解法是首先制备一种在末端以 $^{32}\text{P}$ 标记的单链DNA。通常用多核苷酸激酶将 $^{32}\text{P}$ 引进5'羟基末端。然后选择性地将此标记DNA在四个核苷酸中之一处断开。必须选定一个合适的条件使每一链上平均只有一个断裂。在每一个碱基处的部分切割产生了一套从 $^{32}\text{P}$ 标记原子到该碱基每个位置处的不同放射性片段。例如,如果顺序是



那么在四个碱基中的每一个上的特异切割产生的放射性片段有

在A处切割:  $^{32}\text{P} - \text{GCT}$

$^{32}\text{P} - \text{GCTACGT}$

在G处切割:  $^{32}\text{P} - \text{GCTAC}$

在C处切割:  $^{32}\text{P} - \text{G}$

$^{32}\text{P} - \text{GCTA}$

在T处切割:  $^{32}\text{P} - \text{GC}$

$^{32}\text{P} - \text{GCTACG}$

这些片段随后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。该凝胶能分辨长度上只相差一个核苷酸的DNA分子。下一步就是察看凝胶的放射自显影图了。如图24-50所示,最低的区带是在C道,次一带是T道,再上是A道。因此,前面三个核苷酸的顺序是5'CTA3'。向上依次读出七带,就得出顺序为5'CTACGTA3'。因此,用四种不同的裂解法所产生的凝胶自显影图,为直接读出核苷酸顺序提供了数据。

DNA是怎样被特异切割的呢?使用的试剂能修饰并将碱基从其糖上除去(图24-51)。硫酸二甲酯破坏嘌呤,它使鸟嘌呤在N-7和腺嘌呤在N-3位甲基化。甲基化的嘌呤的糖苷键,在中性pH下被加热断裂,使糖单元不含碱基。然后在碱性条件下加热就能使骨架断裂及糖

基被消除。如此形成的有标记末端的片段可在聚丙烯酰胺凝胶上分离开来，再通过放射自显影就能看到深浅不同的区带谱。深带相当于在鸟嘌呤处断裂产生的片段，因为这种碱基的甲基化速度远比腺嘌呤快。相反，甲基化腺苷的糖苷键却不如甲基化鸟苷的糖苷键稳定。因此，甲基化后如用稀酸处理就更易放出腺嘌呤（A+G道）。将凝胶上A+G道和平行的G道加以比较就可区分断裂发生在A处还是G处（图24-52）。

胞嘧啶和胸腺嘧啶可受胼的作用分解。随后，骨架由六氢吡

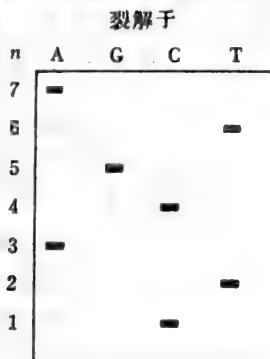


图24-50 电泳凝胶示意图。图示在四个碱基（A，G，C和T道）的每个碱基处对5'-<sup>32</sup>P-GCTACGTA-3'进行特异性切割所产生的放射性片段。片段中含有的核苷酸数(n)示于左。自下而上可直接读出碱基顺序。

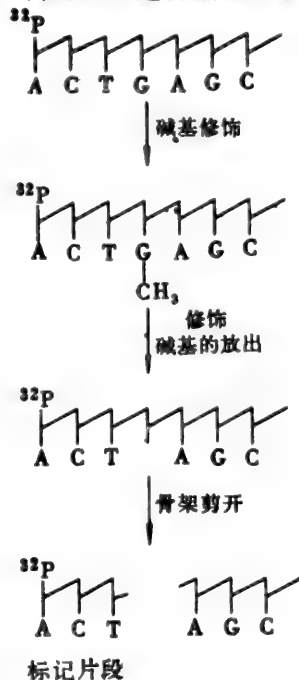


图24-51 化学切割法测定DNA顺序的战略步骤。

啉断裂，后者排弃了胼反应产物并催化磷酸酯的消除。这些反应造成了在胞嘧啶和胸腺嘧啶

处的断裂（C+T道），由而给出一系列的强度略同的凝胶区带。为辨别二种嘧啶，可在2 mol/L NaCl存在下进行胼解，因为此时胸腺嘧啶（C道）的反应受到抑制。随后，比较凝胶上的G，A+G，C+T和C道的放射性区带，就可读出DNA的顺序（图24-52）。因为最短的片段具有最高的电泳迁移率，所以序列的5'端从凝胶的底部起算。多于150个碱基的序列也可通过使用数种凝胶分离和分辨出所有的标记片段而确定其顺序。

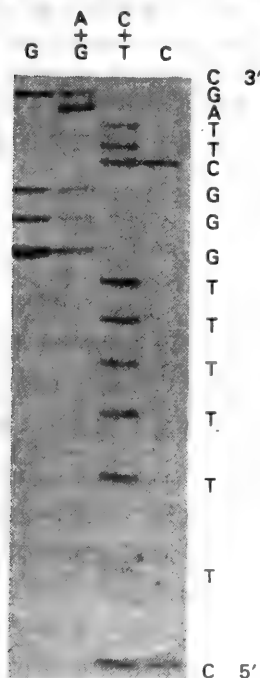


图24-52 凝胶放射自显影图。图示化学裂解产生的标记片段。DNA链的5'端由<sup>32</sup>P标记。在凝胶底部的是最短的核苷酸，因此其碱基顺序是5'-CTTTTTTGGGCTTAGC-3'。[蒙Dr. David Dressler 特许。]

## 采用酶复制技术测定 $\phi$ X174 DNA 的全部碱基顺序

桑格, F. (Fred Sanger) 及其合作者发展了另一种测定 DNA 顺序的技术, 他们通过有控制地中断 DNA 的酶促复制制备一些 DNA 片段。先用 DNA 聚合酶 I 去抄录一特定顺序的单股 DNA。这一合成可用互补片段引发, 后者取自限制酶作用产生的水解液中。培养液中除含四种放射性脱氧核苷三磷酸盐外, 还加入一种脱氧核苷三磷酸盐的 2', 3'-二脱氧类似物。这种类似物的掺入会阻止链的进一步生长, 因为它缺少 3'-羟基以形成下一个磷酸二酯键。于是就产生了 3' 端被该二脱氧类似物占据的片段 (图 24-53)。这样形成的四套链中止片段, 随后可用凝胶电泳进行分离, 并从放射自显影图上读出新 DNA 的碱基顺序。只需用少于微微摩尔量的纯化 DNA 就能测定多达 200 个碱基的顺序。

桑格用有控制的酶复制技术测定了  $\phi$ X174 DNA 的全部 5,375 个碱基的顺序。一个 DNA 基因组全部顺序的阐明是分子生物学中的一个里程碑。从这个巨大成就中获得的丰富信息将在后面章中讨论 (494 页)。

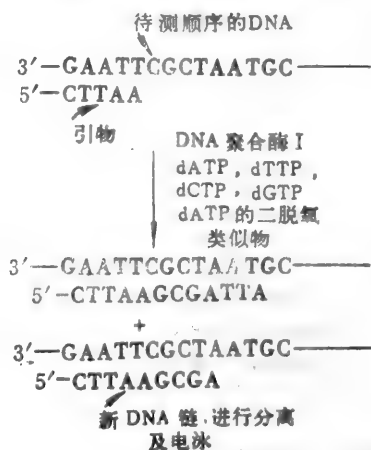
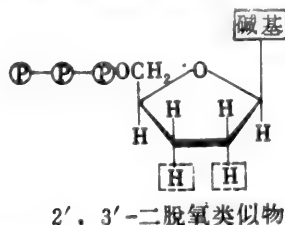


图 24-53 链中止法测定 DNA 顺序的战略步骤。向四个聚合混合液中分别加入一种 dNTP 的 2',3'-二脱氧类似物, 由而得到不同片段。例如, 加入 dATP 的二脱氧类似物可获得终止于 A 的片段。

有意思的是, 桑格完成一个染色体的全部碱基顺序测定, 正好是在他阐明一个蛋白质的氨基酸顺序四分之一世纪之后。

## 概 要

DNA 是所有原核及真核生物的遗传分子。病毒中的遗传物质则是 DNA 或 RNA。所有细胞的 DNA 都由两条很长的、围绕一个共同轴盘转的螺旋状多核苷酸链所组成。双螺旋的两链方向相反。每股链的糖-磷酸酯骨架都在双螺旋的外侧, 而嘌呤和嘧啶碱基则处于内侧。碱基对之间的氢键将这两股链结合在一起。腺嘌呤 (A) 总是与胸腺嘧啶 (T) 配对, 鸟嘌呤 (G) 总是与胞嘧啶 (C) 配对。因此, 双螺旋的一条链互为另一条的互补链。遗传信息就寓于沿链精确排列的碱基顺序中。大多数 DNA 分子都是环状的。环状 DNA 双螺旋的轴本身也可再卷曲成一种超缠绕状态。超缠绕的 DNA 比松弛的 DNA 在外形上更为紧密。

DNA 复制时, 双螺旋的两链解开并分离, 以合成新的 DNA 链。亲代分子的每条链都作为形成新的互补链的模板。因此, DNA 复制是半保留的——每一子代分子由其母体分子中获得一条链。DNA 复制是个复杂过程, 由许多种蛋白质一起参加完成, 其中包括三种 DNA

聚合酶和一种DNA连接酶。DNA合成中的活化前体是四种脱氧核苷5′三磷酸。新链沿5′→3′方向合成，其机制是引物链3′羟基末端对进入合成的脱氧核苷三磷酸盐的最内部的磷原子进行亲核攻击。最重要的是仅当进入合成的核苷酸上的碱基与模板上的碱基是互补时，DNA聚合酶才催化磷酸二酯键形成。换言之，DNA聚合酶是受模板指导的酶。DNA聚合酶I、II和III还都有3′→5′核酸外切酶活性。这种活性能通过去除错接残基而保证复制的高度忠实性。另外，DNA聚合酶I和III又有5′→3′核酸酶活性，这种活性对于DNA的修复和复制都是必要的。

大肠杆菌中DNA的复制始于一个特定原点并向两相反方向顺序同时进行。在复制叉上（这里DNA的两股变成了四股）母体DNA的二股链都是合成新DNA的模板。rep蛋白水解ATP以解开亲代DNA。DNA旋转酶亦有助于DNA解开，它就象一个分子旋轴，将反向超绕泵入亲代DNA。一股DNA（领头链）是连续合成的，而另一股（随从链）则先形成许多1kb的片段。随从链的非连续的装配使沿5′→3′方向原子水平的合成在宏观上表现为3′→5′方向生长。在新DNA合成前先有RNA合成，RNA起引物作用。新生的RNA-DNA链的RNA部分随后被水解而以DNA代之。与同一模板互补的新生DNA片段随后在一个由NAD<sup>+</sup>驱动的反应中由DNA连接酶连接起来。

由离子辐射，紫外线及多种化学品引起的DNA损伤受到不断的修复。例如，由紫外线照射生成的嘧啶二聚物可由特异核酸内切酶所割除。DNA中胞嘧啶自发脱氨而形成的尿嘧啶被一种能区别胸腺嘧啶和尿嘧啶的糖苷酶所去除。

限制酶能辨认有二重对称性的特异序列并能水解此区域内每股DNA的一个磷酸二酯键。这些核酸内切酶可被用来将DNA分子切成特异片段，从而有助于对它们进行分析。快速顺序测定技术的发展依赖于特异的片段化方法和凝胶电泳分离法。这一发展使DNA结构分析出现了革命性的变化。

## 习 题

1. 写出下列序列的互补序列（按标准的5′→3′表示法）：  
(a) GATCAA      (b) TCGAAC  
(c) ACGCGT      (d) TACCAT
2. 双螺旋DNA中一链的组成是：[A] = 0.30, [G] = 0.24（摩尔分数单位），问：  
(a) 在此链中[T]和[C]的组成如何？  
(b) 在此链的互补链中，[A], [G], [T], [C]的组成如何？
3. 有一λ噬菌体的缺失变种，其DNA的外廓长度是15μm，而不是17μm。在这个变种中丢失了多少碱基对？
4. 如果DNA的复制是全保留性的，则梅塞尔森和斯塔耳会得到什么样的结果？在全保留复制1.0和2.0代后（即亲代双螺旋不分开），预计DNA分子的分布如何？
5. 由已知DNA连接酶催化的两条DNA链的连接反应是由NAD<sup>+</sup>或由ATP驱动，视物种而不同。假定发现了一个要求另一种不同的能量供体的DNA连接酶，试提供一个可能作为替代NAD<sup>+</sup>或ATP的物质。
6. 大肠杆菌DNA连接酶在AMP存在下能使超绕环形DNA松弛，而在无AMP时不起作用。此反应的机理如何？为什么反应依赖于AMP？

7. 将化学断裂产生的DNA片段在四道凝胶上分离并经放射自显影，得图24-54。此DNA的5'端是经 $^{32}\text{P}$ 标记的。它的顺序是怎样的？

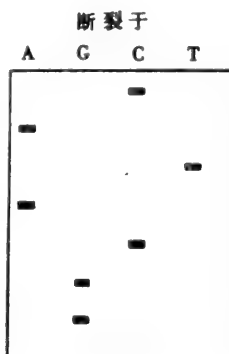


图24-54 一个寡核苷酸经特异裂解获得的放射性片段的凝胶分离结果示意图。

另外的习题，可参阅W.B.Wood, J.H.Wilson, R.M.Benbow, and L.E.Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), chs. 16 and 17.

## 第25章 信使RNA与转录

现在我们转向讨论蕴藏在DNA中的遗传信息的表达。基因对细胞制造各类蛋白质起决定作用。但DNA并非蛋白质合成的直接模板，合成蛋白质的模板是RNA（核糖核酸）。正常细胞遗传信息的流向是：



本章将提出证据表明某些RNA分子是蛋白质合成时携带信息的中间载体，而另一些RNA是蛋白质合成机器的一部分。然后将说明RNA的合成是按照DNA模板的指令进行。转录之后是翻译，即由RNA模板指导蛋白质的合成，这将于第27章讨论。

1940年，即在DNA是遗传物质被揭示的几年前，已经感到RNA可能参与蛋白质合成。卡斯珀森，T. (Torbjörn Caspersson) 利用RNA及DNA在紫外光260nm皆有强烈吸收，而仅只DNA可被福尔根试剂强烈染色这一事实，用光学显微镜确定了RNA及DNA在单个真核细胞中的分布。他发现几乎所有DNA皆存在细胞核内，而大多数RNA分布在胞浆中。布雷切特，J. (Jean Brachet) 把细胞分为细胞核及细胞浆组分，并用化学方法做RNA及DNA分析，也得出如上相同结论。此外，他指出胞浆组分中的RNA与蛋白质一起，位于小颗粒里。这些含有RNA及蛋白质的颗粒经证明是蛋白质合成的场所，现称为核糖核蛋白体（核糖体）。

### RNA的结构

RNA如同DNA一样，是由核苷酸以3'→5'磷酸二酯键相连形成的长而无分枝的大分子（图25-1）。RNA中核苷酸数目可少至75个，多至许多千个。RNA的共价结构与DNA有二方面不同。首先，正如名称所指出的，RNA的糖单元是核糖而不是脱氧核糖。核糖的C<sub>2</sub>含有羟基而脱氧核糖的C<sub>2</sub>无此基团。另一差别是，RNA中的四个碱基之一是尿嘧啶(U)而不是胸腺嘧啶。尿嘧啶与胸腺嘧啶一样，可与腺嘌呤形成碱基对，但它没有胸腺嘧啶所有的甲基。

除有些病毒外，RNA分子皆是单链。因此，一个RNA

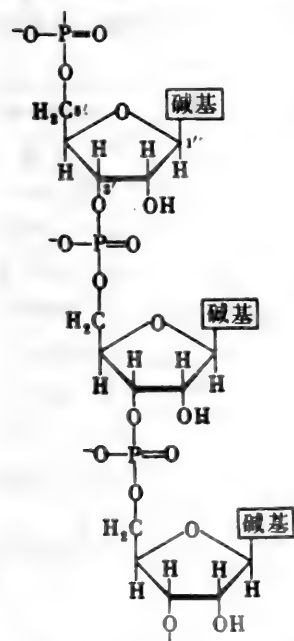
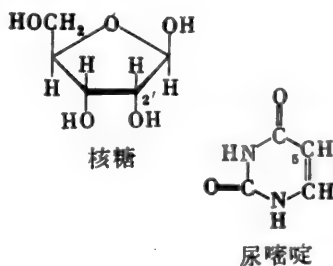


图25-1 部分RNA链的结构。







酶,例如参与乳糖摄取及利用的酶是可诱导的,即在诱导剂如异丙硫半乳糖苷存在下,酶量可增加1000倍以上。诱导作用的动力学很有启示性。在加入诱导剂后几分钟内,就可激起利用乳糖酶的最大合成。此外,去除诱导剂,在同样短的时间内,可使这些酶合成终止。这些实验结果与有稳定酶模板存在的说法相矛盾。因此雅各布及莫诺德推测这信使可能是寿命很短的中间物。他们提出信使必须具有如下性质:

1. 信使是多核苷酸。
2. 信使的碱基成分应反映决定(编码)它的DNA的碱基成分。
3. 由于基因(或基因群)长度不一,所以信使的大小应是不均一的。他们正确地推测三个核苷酸编码一个氨基酸,而信使的分子量至少应是50万。
4. 信使应能暂时地与核糖体——蛋白质合成的场所结合在一起。
5. 信使的合成及降解必是很迅速的。一个推理是碱基类似物如5-氟尿嘧啶在几分钟内即可掺入信使。

雅各布及莫诺德清楚地看到当时并没有一种RNA组分与以上定义符合。当时认为rRNA是蛋白质合成的模板,但其大小过于均一。同时它们的碱基组分,即使在DNA碱基比差异很大的种属中亦是相似的。此外,rRNA稳定,其5-氟尿嘧啶掺入速率很慢。由于同样原因,tRNA亦不像是候选者。并且它的分子太小。但是文献中似有第三类RNA,它似乎符合上述信使的定义。从被噬菌体T<sub>2</sub>感染的大肠杆菌中得到一种新的RNA组分,它的大小合适,半衰期很短。更有意思的是这种新RNA的碱基组成与病毒DNA相似而不与大肠杆菌的DNA相似。

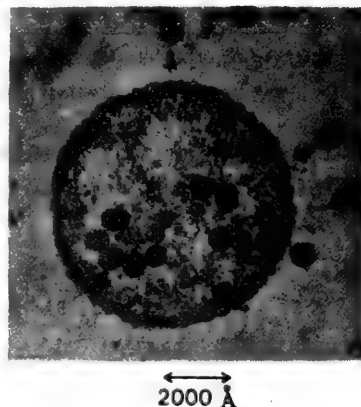


图25-3 T<sub>2</sub>病毒感染大肠杆菌细胞的电镜照片。  
[蒙Dr. Lee Simon特许。]

## 蛋白质合成的信息中间物——信使RNA的实验证据

在蛋白质合成中,存在着一种携带信息的中间物——即短寿命的信使RNA这一假说被提出后不久,即有人进行了验证。布伦纳, S. (Sydney Brenner), 雅各布, F. (Francois Jacob) 及梅塞尔森, M. (Matthew Meselson) 用T<sub>2</sub>噬菌体感染的大肠杆菌进行实验。几乎所有感染后合成的蛋白质在遗传上皆由噬菌体所决定。这些蛋白质合成时并不伴随有RNA的净合成。但在感染后不久却出现少量的短半衰期RNA的组分。事实是,正如前面所提,这种RNA的核苷酸组成类似于噬菌体DNA。这一系统似乎对验证信使的假说是最适宜的,因在其合成的蛋白质中出现了种类上的突然转变。另一有吸引力的特点是在感染后并无rRNA及tRNA的合成。

感染后,合成蛋白质种类的变换怎样出现?一种可能是此噬菌体DNA决定了一组新的核糖体。在此模型中,基因控制了特定核糖体的合成,而每种核糖体仅能合成一种蛋白质。另一由雅各布及莫诺德提出的模型,认为核糖体是非特异结构,它通过一种不稳定的mRNA形式接受来自基因的遗传信息。布伦纳,雅各布及梅塞尔森的实验设计是检查感染后有无新核糖体合成或是新RNA连接在原有的核糖体上。

将细菌放在含重同位素( $^{15}\text{N}$ 及 $^{13}\text{C}$ )的介质中培养,以噬菌体感染,然后即转移到含轻同位素( $^{14}\text{N}$ 及 $^{12}\text{C}$ )的介质中。感染前后合成的成分,由于它们密度不同(分别为“重”及“轻”)可用密度梯度离心法进行分离。新合成的RNA以放射性同位素 $^{32}\text{P}$ -或 $^{14}\text{C}$ -尿嘧啶标记,而新合成蛋白质带有 $^{35}\text{S}$ 。实验结果表明

1. 由于不存在“轻”核糖体,所以核糖体不是感染后新合成的。

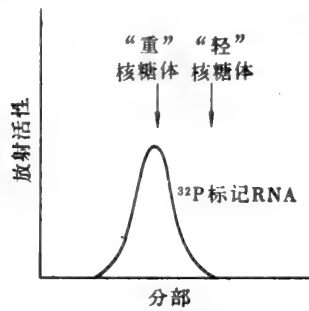


图25-4 正常及T2噬菌体感染的细菌核糖体及RNA的密度梯度离心图。感染后合成的 $^{32}\text{P}$ 标记的RNA与感染前形成的核糖体(“重”核糖体)同一区带。感染后无核糖体形成。

2. 在感染后有RNA合成。大多数放射性标记的RNA出现在“重”核糖体峰中。因此,大多数新的RNA与原有的核糖体结合在一起。进一步实验又表明这些新的RNA在噬菌体生长时转换率很快。

3. 放射性 $^{35}\text{S}$ 短暂地出现在“重”核糖体峰,说明新的蛋白质是在原来存在的核糖体中合成。

从上述实验得出的结论是核糖体是非特异结构,它在一定时间内,合成了由当时正巧与之结合的信使所指定的蛋白质。未感染细菌细胞的研究亦说明,信使RNA是基因与蛋白质间携带信息的联系物。这样,信使RNA的概念很快成为分子生物学的一个中心方面。

### 杂交试验说明信使RNA与其DNA模板互补

1961年,施皮格尔曼, S. (Sol Spiegelman) 发展了一种称为杂交的新技术来回答下列问题: T2噬菌体感染后合成的RNA的碱基顺序是否与T2DNA的碱基顺序互补? 从马默, J. (Julius Marmur) 及多蒂, P. (Paul Doty) 的工作中, 已知将双螺旋DNA加热到熔解温

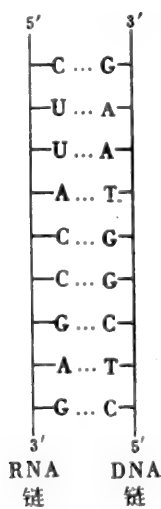


图25-5 当RNA与DNA有互补序列时,可形成RNA-DNA杂交链。

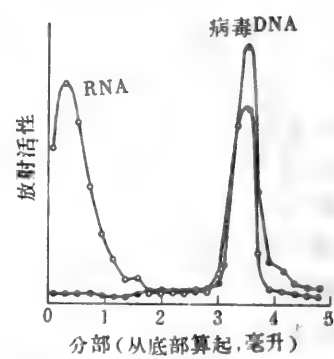


图25-6 大肠杆菌经T2噬菌体感染后产生的RNA与病毒DNA互补。在这杂交实验中, RNA以 $^{32}\text{P}$ 标记, T2DNA以 $^{3}\text{H}$ 标记。经氯化铯密度梯度离心后放射活性的分布表明, 感染后合成的多数RNA处于T2DNA区带。[依据S.Spiegelman. Hybrid nucleic acids. Copyright © 1964 by Scientific American, Inc.]

度以上就形成单链DNA。若将此溶液慢慢冷却,这些单链可以重新结合为有生物活性的双螺旋结构。他们也发现只有当单链来自相同的或密切有关生物体时,才能形成双螺旋分子。这些观察启发施皮格尔曼设想,双股的DNA-RNA杂交链可能从碱基互补的单股DNA和RNA混合液中形成。因此设计下列实验:

1. 用 $^{32}\text{P}$ 标记经T2噬菌体感染大肠杆菌后合成RNA(T2 mRNA)。另外,制备了 $^3\text{H}$ 标记的T2 DNA。
2. 将T2 mRNA与T2 DNA混合液加热至 $100^\circ\text{C}$ ,使双链DNA溶解为单链。再将这含单链RNA及DNA的溶液慢慢冷却至室温。
3. 冷却后的混合液经密度梯度离心分析。样品用离心机离心几天,再从底部将塑料的样品管打洞,收集滴下液体并分析。

结果发现有三条区带(图25-6),其中最深的一条是单链RNA,第二带含双链DNA,在近DNA带处有第三条含有双股DNA-RNA杂交分子链带。以上说明,T2 mRNA与T2 DNA形成杂交物。相反,T2 mRNA与许多来自不同细菌的DNA或即使在碱基比值上类似的无关病毒并不杂交。进一步的实验又证明,非感染细胞的mRNA组分可与来自特定的而不是无关生物体的DNA杂交。这些决定性的实验表明,mRNA的碱基顺序与其DNA模板的互补。而且,发展了一种用于示踪细胞内遗传信息流动以及测定两种核酸分子是否相似的有力工具。

### 核糖体RNA与转移RNA也在DNA模板上合成

杂交技术进一步应用于确定rRNA及tRNA是否亦在DNA模板上合成。但检查RNA-DNA杂交链的形成是用滤过测定法而不是密度梯度离心法。因此法较简单,且更灵敏、快速。单链的RNA可通过硝基纤维素滤器,而双螺旋DNA及RNA-DNA杂交链则不能通过。将大肠杆菌的 $^{32}\text{P}$ 标记RNA加入未标记的大肠杆菌DNA中去,这混合液先加热后慢慢冷却,再经硝基纤维素过滤,然后计数滞留在滤器上的放射活性。结果是非常明确:rRNA(5S, 16S及23S)及tRNA皆与DNA形成RNA-DNA杂交链。这表明在大肠杆菌基因组中存在与这些RNA分子互补的碱基顺序。

### 所有细胞内RNA皆由RNA聚合酶合成

mRNA的概念启发了人们去寻找受DNA模板指导的RNA合成酶。采取了与寻找DNA聚合酶I类似的实验方针。1960年赫维茨, J. (Jerard Hurwitz)及韦斯, S. (Samuel Weiss)皆独立地发现了这种酶,并取名为RNA聚合酶(图25-7)。从大肠杆菌获得的酶,在合成RNA时需要下列成分:

1. 模板 首选的模板是双链DNA。但单链DNA亦可作为模板。RNA不论是单链或双链以及RNA-DNA杂交链都不是有效的模板。
  2. 活化前体 需要所有四种核苷三磷酸——ATP, GTP, UTP及CTP。
  3. 二价金属离子  $\text{Mg}^{2+}$ 或 $\text{Mn}^{2+}$ 都有效。在体内则要求 $\text{Mg}^{2+}$ 。
- RNA聚合酶催化RNA链的起始与延长。这酶所催化的反应是



RNA的合成在某些方面类似于DNA的合成（图25-8）。首先，合成的方向是 $5' \rightarrow 3'$ ，下面即将讨论。第二，延长的机制类似。即进入核苷三磷酸的最接近中间的 $\alpha$ -磷酸，受到延伸链末端的 $3'-OH$ 基的亲核攻击。第三，焦磷酸的水解，推动了合成的进程。

但RNA与DNA的合成在几个重要方面有所不同。第一，RNA聚合酶不需要引物。其次，在RNA合成时DNA模板是全保留的而DNA合成时是半保留。第三，RNA聚合酶未发现有核酸酶的活性。

在大肠杆菌细胞内，所有三种RNA——mRNA, rRNA及tRNA——均由同一RNA聚合酶根据DNA模板给予的指令而合成。而在哺乳动物细胞内存在几种不同种类RNA聚合酶的分工。另外值得注意的是，某些病毒编码的RNA聚合酶与其宿主细胞的聚合酶迥然不同，例如DNA噬菌体T7编码的RNA聚合酶及RNA噬菌体 $Q\beta$ 编码的RNA复制酶。 $Q\beta$ 复制酶是一依赖RNA的RNA聚合酶，因为它接受来自RNA模板而不是DNA模板的指令（第30章）。与此相反，细胞内合成RNA的酶是依赖DNA的RNA聚合酶。

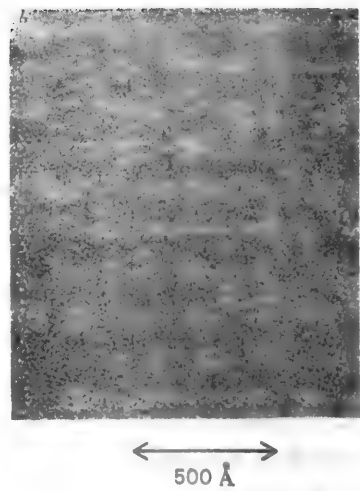


图25-7 大肠杆菌RNA聚合酶的电镜图。  
[蒙Dr. Robley Williams and Dr. Michael Chamberlin特许。]

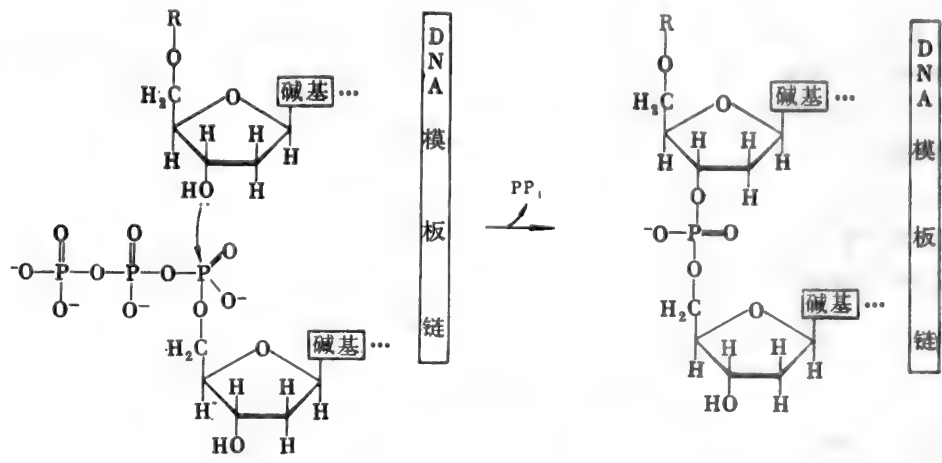


图25-8 由RNA聚合酶催化的链延长反应的机制。

### RNA聚合酶接受DNA模板信息

RNA聚合酶与前章所述DNA聚合酶一样，接受DNA模板的指令。最初的证据是发现新合成的RNA碱基组成与DNA模板链的互补。如果是用一种仅含胸腺核苷酸的多聚脱氧核苷酸——多聚dT作为模板，则仅一种核苷三磷酸（ATP）掺入新合成的多核苷酸链，产物是多聚腺苷酸（缩写为多聚rA）；假如以交替共聚物d(A·T)作RNA聚合酶的模板，则UTP及ATP掺入，产物是多聚r(A·U)。应用单链 $\phi$ X174 DNA作为模板合成的RNA，其碱基

组成进一步证明了RNA产物与DNA模板之间的互补关系（表25-2）。杂交试验同样证明由RNA聚合酶合成的RNA与其DNA模板互补。转录忠实性的最强有力的证明来自碱基顺序研究。它指出RNA的序列是DNA模板序列的精确互补体（图25-9）。

表25-2 根据病毒DNA模板合成的RNA碱基成分

DNA 模板 ( $\phi$ X174正链)		RNA 产物	
A	0.25	0.25	U
T	0.33	0.32	A
G	0.24	0.23	C
C	0.18	0.20	G



图25-9 mRNA的碱基序列与DNA模板链序列互补。上列碱基序列取自色氨酸操纵子。

在基因组特定区域内一般仅有一股DNA被转录

DNA双螺旋模板中是两股均被转录还是仅限其中一条？首先，一般并不认为DNA特定区域中的二条链皆能为功能性蛋白质编码。用 $\phi$ X174噬菌体感染大肠杆菌的杂交研究为上述问题提供了最早的答案之一（图25-10）。 $\phi$ X174噬菌体颗粒含有一单链DNA称正链。在正链进入菌体后，互补DNA负链的合成产生了环状双链DNA分子称复制双链（RF）。RF DNA指导mRNA的合成，后者再指导噬菌体蛋白质的合成。先将大肠杆菌用 $\phi$ X174噬菌体感染，接着在培养基中加入 $^{32}\text{P}$ -磷酸盐以制备放射性的噬菌体mRNA，将此标记的mRNA分离出来。同样，也将RF DNA的正负二链分离，这可利用它们碱基组成不同，因此浮力密度不同的原理。以后进行杂交试验，观察新合成的mRNA是与正链或负链或二链互补。得到明确的结果是：仅RF DNA的负链与标记mRNA形成杂交体。所以在活体内， $\phi$ X174的RF DNA中仅一条链是转录的模板。

与此类似，诸如T7, SP8, 及 $\alpha$ 的病毒DNA在活体内亦仅只一股单链被转录。但在病毒T4或 $\lambda$ 噬菌体中情形较为复杂。基因组中的某些部分是以一条链作为模板，而在另一区域，则另一链可能是模板。在大肠杆菌中，同样亦存在一组基因与另一组基因模板的改链。

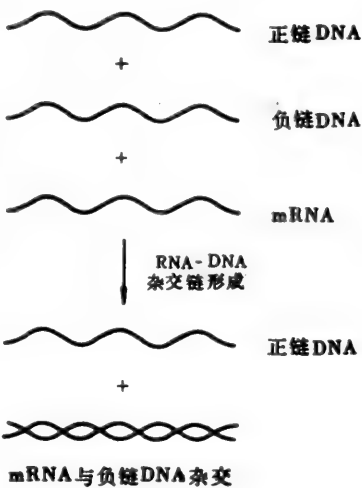


图25-10 这一杂交试验表明， $\phi$ X174的RF DNA中仅一链为转录模板。

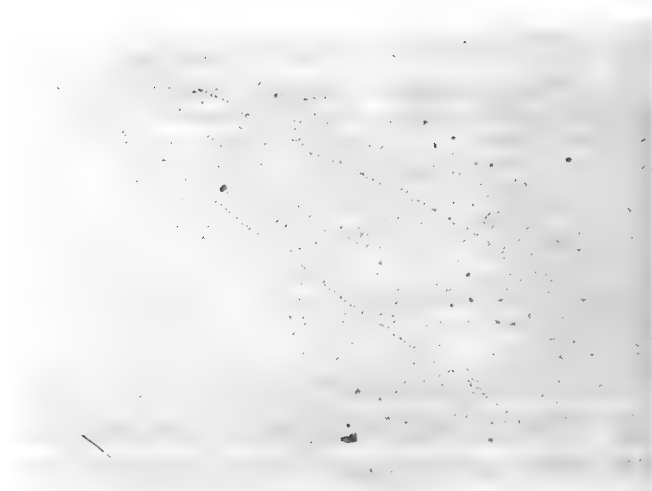


图25-11 示转录过程的电镜图。[引自O. L. Miller, Jr., and Barbara A. Hamkalo. Visualization of RNA synthesis on chromosomes. *Int. Rev. Cytol.* 33 (1972): 1.]

### 大肠杆菌的RNA聚合酶由亚基组成

大肠杆菌的RNA聚合酶是一很大而复杂的酶。整个酶的质量近500kda。通过尿素解聚试验，可知RNA聚合酶由亚基组成（表25-3）。整个酶的亚基组成是 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ，即称为全酶。下面即将讨论到， $\sigma$ 亚基在RNA合成起始后，即从全酶中离解下来。没有 $\sigma$ 亚基的RNA聚合酶称为核心酶（ $\alpha_2\beta\beta'$ ）。RNA聚合酶的催化中心在 $\alpha_2\beta\beta'$ 核心酶中。 $\beta'$ 亚基与DNA模板的结合作用有关。而 $\beta$ 亚基在底物核苷三磷酸结合中有关。转录时，全酶的 $\sigma$ 亚基参与选择起始位点。

表25-3 大肠杆菌RNA聚合酶的亚基

亚 基	数 目	质 量
$\alpha$	2	40
$\beta$	1	155
$\beta'$	1	165
$\sigma$	1	95

由大肠杆菌RNA聚合酶催化的RNA合成作用，经如下三阶段：①起始，②延长，③终止。下面将逐一讨论。

### 在DNA模板的启动子上开始转录

转录作用开始于DNA模板的特定位点即启动子（启动基因）上。RNA聚合酶怎样发现这些位点？一种探讨这问题的办法是将用胰DNA酶消化时得到RNA聚合酶全酶保护的DNA片段加以分离并测定其碱基顺序。另一方法是借增加或减少特定基因的转录率来分析某些变种。这些研究表明，启动部位含有约40碱基对，它相当于约140Å长的DNA片段。对大肠杆菌及噬菌体DNA的各种启动子的分析提示，在mRNA开始点前的10个碱基对左右，有个7碱基对序列，它是识别信号的关键部份（图25-13）。另一识别部位距mRNA起始点前约35碱基处，它可能与RNA聚合酶的开始结合有关。

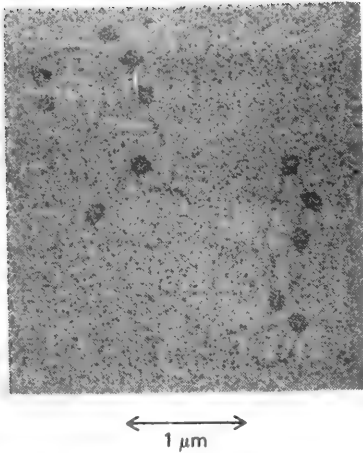


图25-12 结合在T7噬菌体DNA片段的几个起动位点上的RNA聚合酶全酶电镜图。[引自R. C. Williams. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 (1977): 2313.]

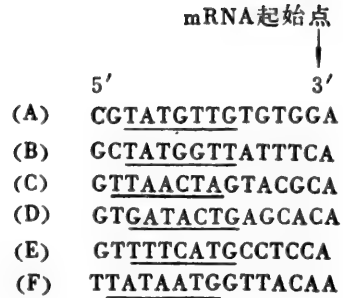


图25-13 起动子的顺序：大肠杆菌的(A) *lac*, (B) *gal*, (C) *trp* 操纵子；(D)  $\lambda$  噬菌体；(E)  $\phi$  X 174 噬菌体；(F) SV 40 病毒。推测的同源区（称 Pribnow 顺序）下划线表示。

## $\sigma$ 亚基使RNA聚合酶识别起动位点

RNA聚合酶的核心 $\alpha_2\beta\beta'$ 不能在起动位点上开始转录，必需要全酶 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 才能开始特异起动。 $\sigma$ 亚基的作用是通过下列途径发现。经磷酸纤维素柱层析纯化的RNA聚合酶，以T4DNA作模板时几乎全无活性，但以小牛胸腺DNA作模板时仍具很大活性。相反，经甘油梯度离心纯化的RNA聚合酶对二种模板均具很高的活性。这一观察提示，在用磷酸纤维素纯化RNA聚合酶时有一种因子可能丢失。后来证实确实如此(图25-14)。如于磷酸纤维素纯化的酶组分中，加入另外一个层析洗脱组分，则其活性显著加强。这个刺激组分叫做 $\sigma$ 因子，它本身并无催化活性。以后实验表明，用磷酸纤维素纯化的酶缺乏 $\sigma$ 亚基，而用甘油梯度纯化的酶，仍保留有此亚基。所以，对T4DNA模板的转录具完整活性的是 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 全酶，而 $\alpha_2\beta\beta'$ 核心酶是无效的。把 $\sigma$ 加入核心酶就使其具完全活性的全酶得以重建。核心酶能转录小牛胸腺DNA的原因是这模板含有许多裂口。在体外由核心酶合成的RNA与体内转录本并不一致。例如，核心酶对噬菌体DNA模板的二条链均能转录，但全酶如同在体内发生的一样，只是不对称地转录其中一个单链。

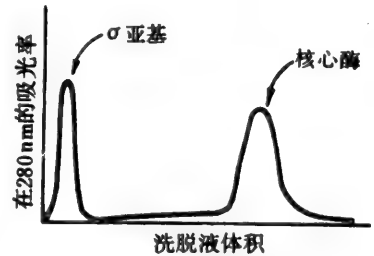


图25-14 磷酸纤维素柱层析法分解RNA聚合酶为 $\sigma$ 亚基及核心酶( $\alpha_2\beta\beta'$ )。

$\sigma$ 亚基对特异起动作用是使RNA聚合酶对DNA一般区域的亲和性减少 $10^4$ 倍。此外， $\sigma$ 激活RNA聚合酶使之识别起动序列。 $\sigma$ 亚基也参与解开DNA的双链，使其中之一担任模板。事实上，由于RNA聚合酶全酶的结合，约有一圈DNA螺旋被解开。这样就为新RNA链中第一个磷酸二酯键的形成作好准备。

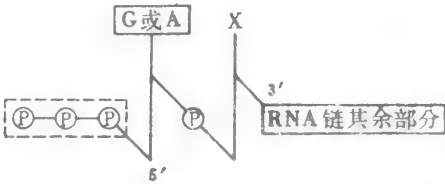
当新的RNA链合成开始后， $\sigma$ 亚基就从全酶中解离下来。核心聚合酶则继续对DNA模板转录。因此全酶的作用是识别和起始，而核心酶的作用是延长。解离下来的 $\sigma$ 亚基于是与

另一核心聚合酶连接，开始新一轮转录作用。

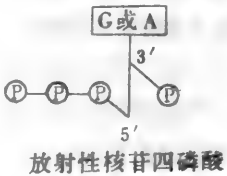
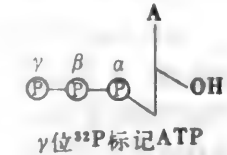
新RNA链的起始受到多方面的控制。有的启动子序列高效地刺激启动；而另一些则不很有效。起始速率亦受到结合在DNA上的启动部位或其附近的蛋白质的调节。阻遏物通过干扰RNA聚合酶结合，可阻断转录作用，而正调节因素则通过易化RNA聚合酶的结合而加强起始。这些重要的控制机制，将在第28章详细讨论。

### RNA链以pppG或pppA开始

许多新合成的RNA链皆带有一标志，由此可推测RNA链是怎样开始的。新RNA链5'末端是高度有特色的：分子以**PPP**G或**PPP**A开始。与DNA合成相反，RNA合成不需引物，RNA链可从头新合成。



这个5'末端的令人注意的标志经两种途径被发现。当温育液中含有 $\gamma$ 位 $^{32}\text{P}$ 标记的ATP时，RNA链中就有 $^{32}\text{P}$ 掺入。这清楚地指出掺入的标志必定在末端位置，因为只有核苷三磷酸分子中的 $\alpha$ 磷酸原子可成为RNA链内部的磷酸二酯键的一部分。此外，用碱水解新合成的RNA产生三类产物：核苷，核苷2'-(或3')磷酸及核苷四磷酸(图25-15)。当以 $\gamma$ 位 $^{32}\text{P}$ 标记的ATP作底物时，形成的是腺苷3'磷酸5-三磷酸。这核苷四磷酸的 $\gamma$ 位磷酸原子是标记的。在应用 $\gamma$ 位标记 $^{32}\text{P}$ 的GTP时，得到相应的结果。但是，当用 $\gamma$ 位标记的UTP或CTP时，则无放射活性掺入。所以，新的RNA链的5'末端有三磷酸基团而它的3'末端是游离羟基。



### RNA链的合成沿5'→3'方向进行

RNA链合成的方向是沿5'→3'或是3'→5'? 图25-16示二种相反的链延长机制。若由5'→3'方向伸长，则三磷酸末端于合成起始时入链；若是3'→5'方向生长，则三磷酸末端来自掺入的最后残基。通过 $\gamma$ 位 $^{32}\text{P}$ 标记的GTP(或ATP)放射活性掺入RNA合成的动力学研究，可对上述问题作出抉择。在用 $\gamma$ 位 $^{32}\text{P}$ 标记GTP为底物时，掺入的 $^{32}\text{P}$ 与总的核苷酸掺入的比值于这些成分混合后不久达最高值，以后则随时间的延长，比值逐渐地降低。此外，向温育混合液中再加入大量非放射性GTP后，已经标记的RNA的总放射活性亦并不降低。因此， $^{32}\text{P}$ 掺入RNA分子是在合成开始时，而不是在最后步骤。所以，RNA链的生长与DNA合成一样，是沿5'→3'方向。

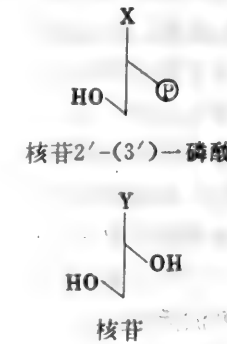
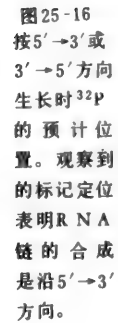


图25-15 用 $\gamma$ 位 $^{32}\text{P}$ 标记ATP合成的RNA链的碱水解产物。

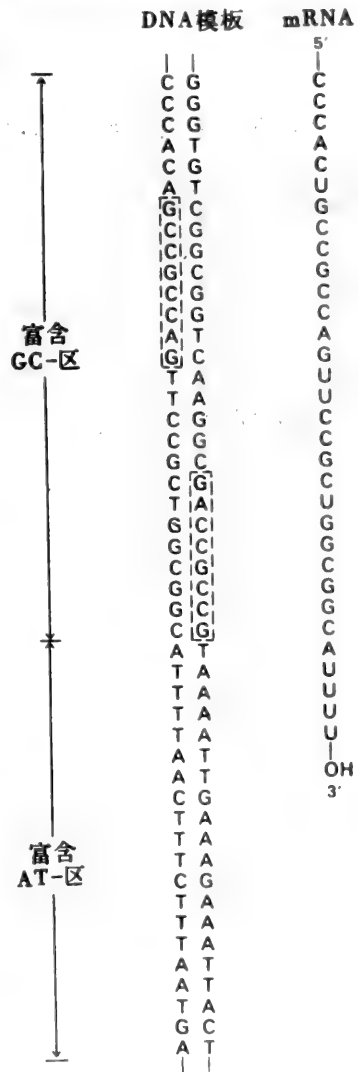




值得注意的是RNA聚合酶不具核酸酶活性。与DNA聚合酶相反,RNA聚合酶并不校正新生多核苷酸链。依次,转录作用的忠实性也就大大低于复制。RNA合成的错误率是每 $10^4$ 或 $10^5$ 个核苷酸序列出现一次,因此比DNA合成大 $10^5$ 倍。但是,由于细胞内一个基因可合成许多转录本,所以RNA合成的颇低忠实性还是能容忍的。

DNA模板含有转录的终止信号

图25-17 与大肠杆菌 *trp* mRNA 的3'末端相应的DNA顺序。一个二重对称轴(黑斑)将有关碱基对(框内)联系起来。



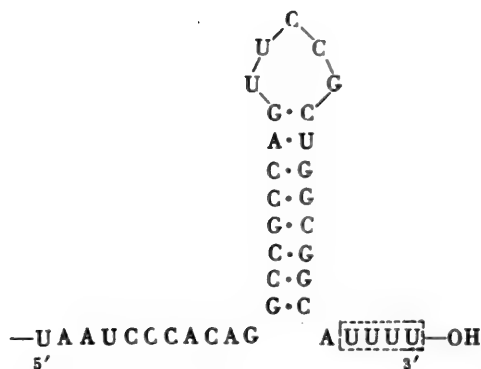


图25-18 大肠杆菌色氨酸操纵子的mRNA转录本的3'末端碱基顺序。能形成稳定发夹结构。

### rho蛋白参与转录的终止作用

rho蛋白参与某些部位的终止作用，其依据是人们发现在体外当rho蛋白存在时合成的RNA链短于rho蛋白不存在时。例如，从噬菌体DNA合成的RNA，当有rho蛋白存在时，沉降系数为10S，当无rho蛋白存在时为23S。关于rho蛋白作用的其他知识来自下列实验：把这一终止因子加入到RNA合成起始后温育不同时间的反应液中。当加入时间是起始后几秒钟、二分钟及十分钟时，所得RNA分别是13S，17S和23S。这结果提示在模板上至少含有三个与rho蛋白反应的终止部位（产生10S，13S及17SRNA）及一个不需rho蛋白（产生23SRNA）的终止部位。因此，特异的终止作用在无rho蛋白存在下能够发生。但rho蛋白可以识别单凭RNA聚合酶不能识别的其他终止信号。

rho蛋白是怎样在某些终止信号部位引起RNA合成的终止？一种可能是，rho蛋白是

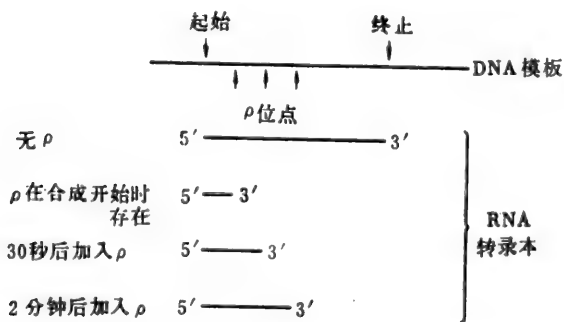


图25-19 rho因子对RNA转录本大小的影响。

特化的终止信号称**衰减子**（衰减基因），它可根据细胞营养需要而受到调节（528页）。

200kdal的四聚体，附着在RNA上，并向停顿在终止位点的RNA聚合酶。依此模式，rho蛋白在RNA的3'-OH末端置换了RNA聚合酶，从而释放了RNA转录本。值得注意的是rho蛋白使ATP在转录终止时水解。

可以预料，某些基因转录的终止是被调控的。如将在下面叙述的，噬菌体能合成容许某些基因转录和表达（530页）的**抗终止蛋白**，大肠杆菌中还有

### 许多RNA分子在转录后被裂解及化学修饰

转录完成后，继续形成具有功能的活化RNA分子。在原核细胞中，**mRNA及rRNA**分

子由某些新生 RNA 链的裂解及化学修饰后形成。例如，大肠杆菌的三种 rRNA 及一种 tRNA 分子是由含有间隔区的初级 RNA 转录本剪切形成。图 25-20 所示即为存在此情况之例。另外一些转录本含有几种 tRNA 的序列或同一 tRNA 序列的几个拷贝。裂解及剪切这些 rRNA 及 tRNA 前体的核酸酶是高度精确的。例如，大肠杆菌的核酸酶 P 能正确地制成其全部 tRNA 分子的 5' 末端。核酸酶 III 通过裂解初级转录本的双螺旋发夹区的特异位点而切下 5S、16S 及 23S rRNA 前体。相反地，原核细胞的 mRNA 分子不经过或很少被修饰。事实是它们在转录时，其中许多就同时被翻译。不过，有些病毒的 mRNA（如 T7 噬菌体 mRNA），在被翻译前也由核酸酶 III 裂解。

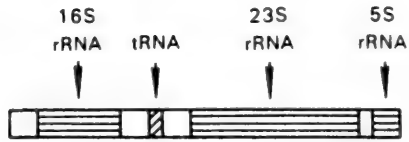
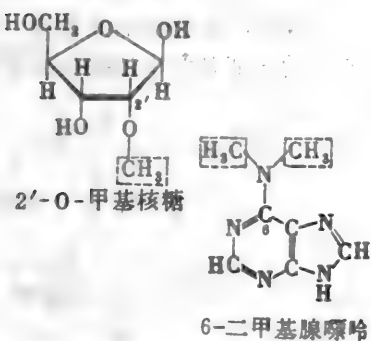


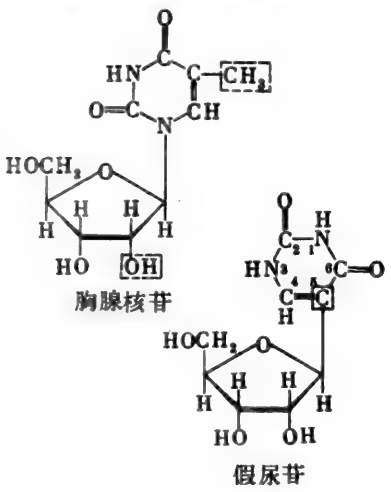
图 25-20 初级转录本的裂解产生 5S、16S 及 23S rRNA 分子及一个 tRNA 分子。间隔区以无色表示。

第二种类型的加工是在有些 RNA 链末端加上核苷酸。例如，将 CCA 加到原来不具有此末端序列的 tRNA 分子的 3' 末端上。在真核细胞中则是将长段的多聚 A 加在大多数 mRNA 分子 3' 末端，将甲基化鸟核苷酸（称作帽）加在 5' 末端（551 页）。

第三种类型加工是碱基和核糖单位的修饰。在真核细胞的 rRNA 中，一百个核糖单位中约有一个其 2'-OH 由 S-腺苷甲硫氨酸经酶促被甲基化。在细菌中则是 rRNA 的碱基而非核糖单位被甲基化。特别有趣的是所有 tRNA 分子中均含有稀有碱基（503 页），它们是由 tRNA 前体中的常见核苷酸经酶促修饰而形成的。例如假尿苷酸及胸腺嘧啶核苷酸是尿嘧啶核苷酸残基在转录后修饰形成。

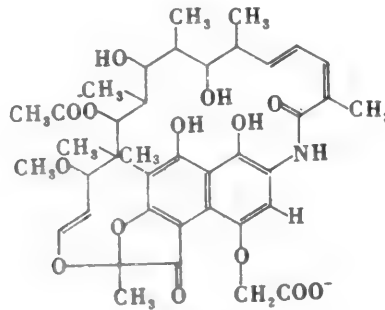


在真核细胞中，所有 RNA 转录本皆需普遍加工。rRNA 及 tRNA 前体的裂解和修饰类似原核细胞。突出区别是真核细胞的 mRNA 来自一庞大转录本序列的裂解与拼接，这将于后章中（551 页）讨论。真核细胞的转录与翻译在细胞的不同区域进行。似乎 RNA 的加工对调节 mRNA、rRNA 及 tRNA 从胞核到胞浆的转运方面起了关键性的作用。



## 转录的抗菌素抑制物：利福霉素及放线菌素

抗菌素是令人感兴趣的分子，因为它们大多数是生物过程的高度特异抑制剂。放线菌素及利福霉素是二种通过不同途径抑制转录的抗菌素。来自链丝菌的利福霉素及其半合成衍



利福霉素 B

物利福平，皆能特异抑制 RNA 合成的起始。这种抗菌素不阻挠 RNA 聚合酶与 DNA 模板的结合，但利福平干扰 RNA 链的第一个磷酸二酯键的形成。相反，看不到它对链延长的影响。利福平抑制作用的高度选择性使它成为极有用的实验工具。例如，可用它阻断新 RNA 链的起始而不影响正在合成的链的转录。利福平的作用位点可能是在 RNA 聚合酶的  $\beta$  亚基。抗利福平的大肠杆菌突变株 (称 *rif-r* 突变种) 已被分离。有些突变种的  $\beta$  亚基的电泳迁移率有所改变。

来自链丝菌的含多肽抗菌素——放线菌素 D 抑制转录作

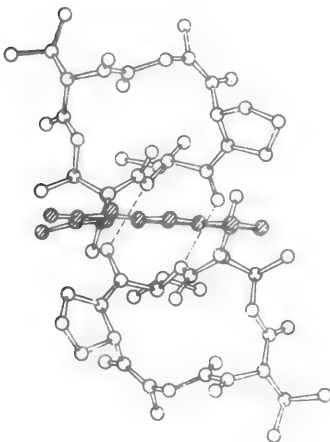
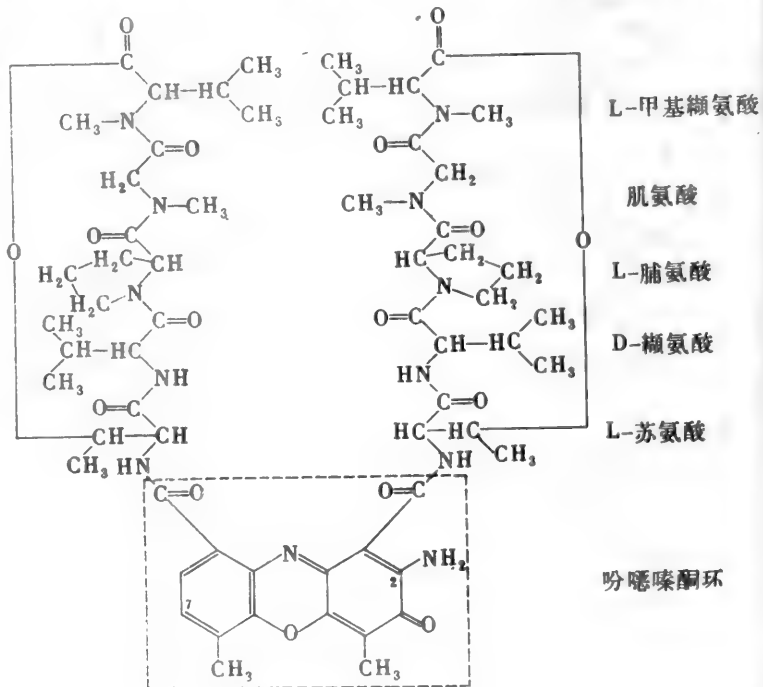


图 25-21 放线菌素 D 模式图。吩噻嗪酮环以斜线球表示；环肽以无色球表示。[蒙 Dr. Henry Sobell 特许。]



放线菌素 D

图 25-22 放线菌素 D 的结构。

用的机制与利福平完全不同。放线菌素D紧密地结合在双螺旋DNA上，使之不能发挥RNA合成时的模板作用。它含有二个相同的环肽，连接在吩噻嗪酮环上(图25-21，图25-22)。这些环肽的组成很特殊，它有肌氨酸、甲基缬氨酸、D-缬氨酸。此外，在苏氨酸的羟基与甲基缬氨酸的羧基间有一酯键。

放线菌素D紧紧地与双螺旋DNA结合，但与单链DNA或RNA，双链RNA及RNA-DNA杂交链均不能结合。此外，在鸟嘌呤残基存在时，放线菌素D与DNA结合作用显著加强。用光谱法及流体力学方法对放线菌素D与DNA的复合物研究指出，放线菌素D的吩噻嗪酮环正好进入DNA的相邻碱基对中，这种结合形式称为“嵌入”(图25-23)。低浓度时，放线菌素D抑制转录而对DNA复制无可见影响。同样，蛋白质合成亦不直接被放线菌素D抑制。由于这些原因，放线菌素D被广泛地用作原核或真核细胞中新RNA形成的特异抑制剂。

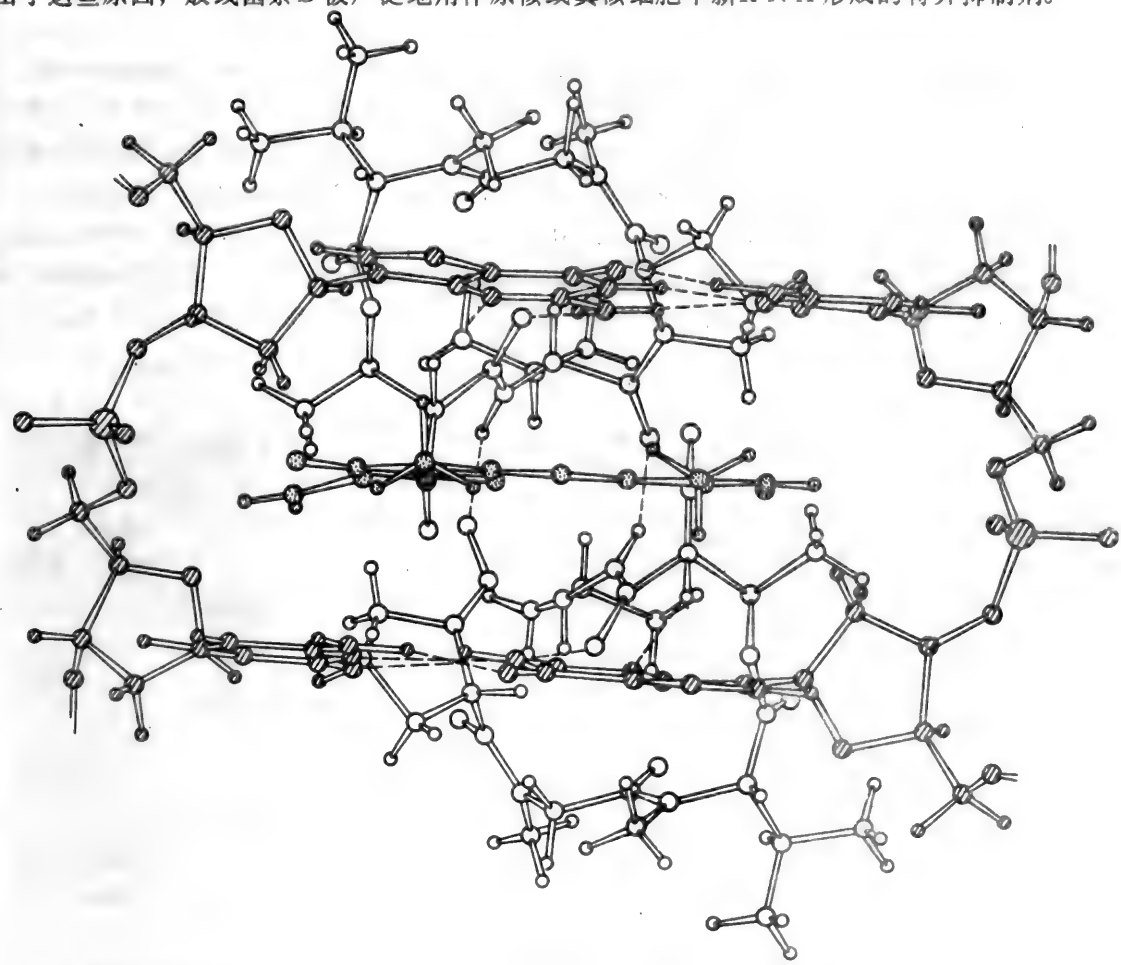


图25-23 建议的放线菌素D与DNA复合物的结构。放线菌素D的吩噻嗪酮环（点球）嵌入在DNA的二个G-C碱基对（斜线球）中间。放线菌素D的环肽（无色球）结合在DNA双螺旋浅沟中。在放线菌素D与邻近的鸟嘌呤间存在几个氢键。放线菌素亚基相关的对称轴与DNA双螺旋的糖-磷酸酯骨架及碱基序列相关的对称轴相符合。[依据Dr. Henry Sobell热情提供的图。]

一分子放线菌素与二分子脱氧鸟苷形成的复合物结晶的结构，最近已在原子分辨率水平上得到解决(见图25-23)。在此复合物中放线菌素的吩噻嗪酮环夹在二个鸟嘌呤环中间。一

个环肽位于吩噻嗪酮环之上,另一在其下。两个肽各与鸟嘌呤残基的 2-氨基形成强的氢键。在抗菌素与核苷之间还存在许多有利于 van der Waals 相互作用的点。这个复合物的一个显著特点是它几乎是对称的;在沿中央 O 和 N 原子连线上,有二重对称轴。这个复合物的构象指出放线菌素 D 识别 DNA 中 GpC 碱基顺序。应注意,假使 DNA 中一条链的顺序是 5' GpC 3', 其互补链顺序必定是 3' CpG 5'。放线菌素可能也就是嵌入 DNA 的二个 GC 碱基对中间,并与 G 残基产生类似于它与脱氧鸟苷复合物中的那种相互作用。在此模式中,环肽单位位于 DNA 双螺旋的浅沟中。这模式的一个关键点是放线菌素的对称性与 DNA 中的特异碱基序列的对称性相配。

## 已建立起强有力的 RNA 顺序测定方法

利用凝胶电泳的高分辨率,已能将 RNA 分子的顺序象 DNA 分子那样,快速直接地测定出来。首先将 RNA 链 3' 或 5' 末端用放射性基团来标记。将标记链进行不完全消化,使链断于四种碱基中之一处,以获得分套的片段组。可用碱基特异的核酸内切酶以完成特异(或选择性)的断链(表 25-4)。例如,核糖核酸酶 T<sub>1</sub> 在 RNA 链的 G 残基的 3' 端催化水解。亦可将四种碱基中任一种加以化学修饰后,主干在损伤碱基处裂解,以获得 RNA 的特异片段组。四组片段可用凝胶电泳分离,然后 RNA 的碱基顺序如同 DNA 那样(460 页),可直接从放射自显影图上读出(图 25-24)。用这方法可容易地测知含 100—200 个碱基的 RNA 分子顺序。

表 25-4 用作 RNA 顺序测定的酶

酶	类型	底物	产物
核糖核酸酶 T <sub>1</sub>	核酸内切酶(和核酸外切酶)	—XpGpYpZ—	—XpGp+YpZ—
胰核酸酶	核酸内切酶(和核酸外切酶)	—XpUpYpZ—	—XpUp+YpZ—
		—XpCpYpZ—	—XpCp+YpZ—
核糖核酸酶 U <sub>2</sub>	核酸内切酶(和核酸外切酶)	—XpGpYpZ—	—XpGp+YpZ—
		—XpApYpZ—	—XpAp+YpZ—
核糖核酸酶 I (取自 <i>P. polycyphalum</i> )	核酸内切酶(和核酸外切酶)	—XpNpYpZ—	—XpNp+YpZ—
碱性磷酸酶(取自大肠杆菌)	磷酸酶	—YpZp	—YpZ+P <sub>i</sub>
		pXpY—	XpY—+P <sub>i</sub>
牛脾磷酸二酯酶	核酸外切酶	XpYpZ—	Xp+YpZ—
蛇毒磷酸二酯酶	核酸外切酶	—XpYpZ	—XpY+pZ
多核苷酸激酶	激酶	ATP+XpYp—	pXpYp—+ADP

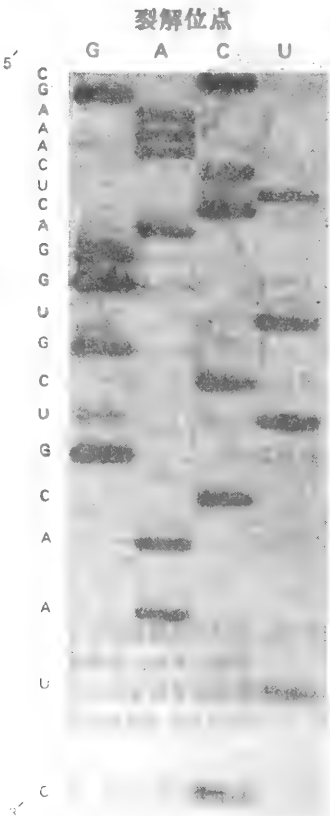


图 25-24 酵母 5S RNA 片段的放射自显影图。3' 末端有放射性。四条道分别示在 G, A, C 及 U 处裂解的产物。上图的顺序是: 5'-CGAAACUCAGGUGCUGCAAUC-3' [引自 D. A. Peattie. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76 (1979): 1762.]

另一策略是分析互补 DNA 分子的顺序而不是RNA本身。如何获得互补DNA片段?一种方法是用限制性核酸内切酶将大分子DNA片段化。通过与欲测RNA杂交作用,可将互补DNA序列识别出来。或用另一方法,以RNA为模板,应用从肿瘤病毒获得的反转录酶来合成互补DNA (583页)。人血红蛋白 $\beta$ 链的mRNA的576个核苷酸的整个顺序确实就是用这种方法测得的。

## 概 要

正常细胞遗传信息的流向是从DNA→RNA→蛋白质。以DNA为模板合成RNA称为转录,而以RNA为模板合成蛋白质称为翻译。有三种类型的RNA分子:信使RNA(mRNA),转移RNA(tRNA)以及核糖体RNA(rRNA)。这些RNA分子均系单链。tRNA及rRNA含有较多由于链的折迭成发夹结构而形成的双螺旋区。最小的RNA是tRNA,它约含75个核苷酸,而最大的是某些mRNA,它可能含5000个以上的核苷酸。长RNA链的顺序可通过裂解成片段再经凝胶电泳分离后加以测知。

所有细胞内的RNA都是经过RNA聚合酶的作用,按DNA模板提供的信息合成的。活化中间物是核苷三磷酸。RNA合成的方向如同DNA合成一样,从5'→3'。RNA聚合酶与DNA聚合酶的不同在于不需引物,并不具核酸酶的活性。另一区别是RNA合成时,DNA模板是全保留的,而在DNA合成时是半保留的。大肠杆菌RNA聚合酶的亚基结构是 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ,其质量接近50万道尔顿。核心酶含有 $\alpha_2\beta\beta'$ 。 $\sigma$ 亚基通过促使RNA聚合酶识别DNA模板上的起始信号,能加强转录速率及特异性。RNA聚合酶在这些启动子区域上的结合,导致DNA模板局部解链,由而为第一个磷酸二酯键形成安排了场地。RNA链以pppG或pppA开始。 $\sigma$ 亚基在新链合成起始后即从全酶上解离。转录的终止与它的起始一样受精确调控。DNA模板上含有转录的终止信号,其中有些能被rho蛋白识别。转录作用可被特异抑制剂所阻断。例如抗菌素利福平抑制RNA合成的起始,而放线菌素D阻滞RNA链的延长。许多RNA分子在转录后被裂解及化学修饰(例如甲基化)。原核细胞的tRNA及rRNA分子受到广泛加工而mRNA则很少进行修饰。但在真核细胞中,所有RNA的转录本都经广泛的修饰。

## 习 题

1. 从以下方面比较大肠杆菌的DNA聚合酶I及RNA聚合酶:
  - (a)亚基结构
  - (b)活化前体
  - (c)链延长方向
  - (d)核酸酶活性
  - (e)模板保留性
  - (f)引物要求
  - (g)延长反应的能力学
2. 写出按下列DNA模板序列合成的mRNA分子序列  
5'-ATCGTACCGTTA-3'
3. 为什么RNA易被碱水解,而DNA不易?
4. 3'-脱氧腺苷如何阻断RNA合成?
5. 用下列每种酶将寡核苷酸5'-pGCAGUACUGUC-3'部分水解,可得哪些产物?
  - (a)胰核糖核酸酶

(b)核糖核酸酶 $T_1$

(c)核糖核酸酶 $U_2$

(d) *Physarum*核糖核酸酶 I

6. 用胰核糖核酸酶将寡核苷酸广泛水解得产物 $Cp$ ,  $2Up$ ,  $AGCp$ 及 $GAAUp$ 。用核糖核酸酶 $T_1$ 水解同一寡核苷酸得 $AAUp$ ,  $UAGp$ 及 $CCUGp$ 。问此寡核苷酸顺序是什么?

另外的习题, 参看W. B. Wood, J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood,  
*Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), chs. 16 and 17.



## 第26章 遗传密码和基因-蛋白质间的关系

前一章叙述了在基因和其多肽产物间作为信息传递中间物的信使RNA的作用。本章将继续讨论信息从基因向蛋白质的传递。中心议题是遗传密码，它代表了DNA（或其转录的mRNA）的碱基顺序和蛋白质中氨基酸顺序之间的关系。所有生物的密码都相同，因为它简明，故显得优美。三个碱基称为一个密码子，它决定着一个氨基酸。密码子被转移RNA（tRNA）分子依次破读，后者在蛋白质合成中起着接合器的作用。1960年遗传密码被完全阐明是近代生物学上的一个杰出的成就。

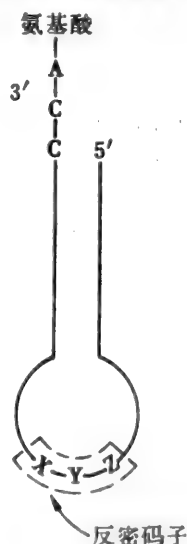
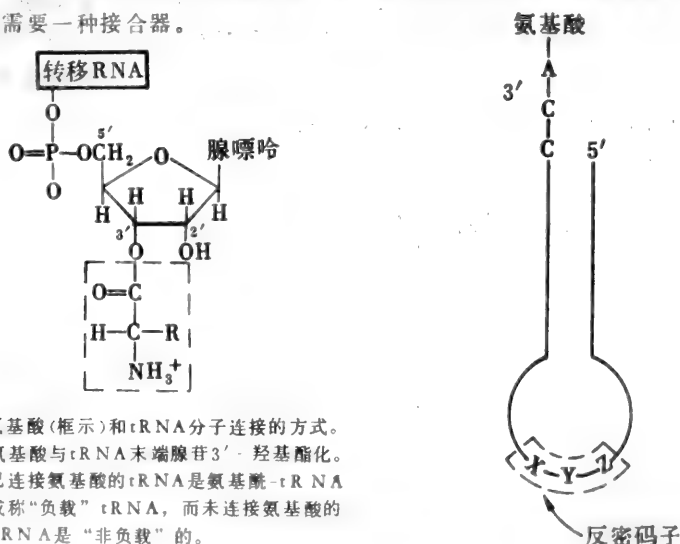
### 转移RNA是蛋白质合成中的接合器分子

已知mRNA是蛋白质合成的模板。它如何指导氨基酸以正确的顺序连接起来呢？1958年克里克，F. (Francis Crick)写道：

人们第一个朴素的想法认为，RNA采取了一种可形成二十种不同“洞穴”的构型，每一种洞穴相应于二十种氨基酸中的一种侧链。若真如此，人们可望倒回去解决问题——即试图形成这些洞穴从而去了解RNA的构型，但所有这些尝试都失败了。根据物理化学观点这个想法也是极少可能的。

他发现RNA没有似突节的疏水表面足以辨别缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸，也没有一定的带电基团布局可辨别带正电荷和带负电荷的氨基酸侧链。因此，克里克提出了一个识别mRNA模板的完全不同的机制：

…RNA主要提供了一些可生成氢键的顺序排列性的位点。因此，人们预期无论何物进入模板，必是通过形成氢键的方式。故一个自然的设想就是认为，氨基酸是由一种接合器分子携带到模板上去的，而真正与RNA配对的是这种接合器。这个概念的最简单形式就是需要有二十种接合器，相应于一种氨基酸需要一种接合器。



这个高度创新的假说很快就变成了一个公认的事实。蛋白质合成中的这种接合器就是 **tRNA**。下一章将要详细讨论这些特异接合器的结构和反应。目前只要知道 tRNA 上有一个与氨基酸连接的部位和一个与模板识别的部位 (图26-1和图26-2)。一个 tRNA 分子携带一个特异的活化氨基酸进入蛋白质合成的场所。氨基酸的羧基与 tRNA 链3'-末端核糖单位的3'-(或2'-)羟基酯化。在蛋白质合成时此酯化的氨基酸可在2'-或3'-羟基间转移。氨基酸与 tRNA 连接形成氨基酰-tRNA是由一种特异的氨基酰-tRNA 合成酶 (或称活化酶) 催化的。此酯化反应由ATP驱动。二十种氨基酸各至少都有一种特异的合成酶。tRNA上识别模板的部位是三个碱基组成的序列称反密码子 (图26-2)。在 mRNA 上被 tRNA 反密码子识别并与之互补的三个碱基序列, 称密码子。

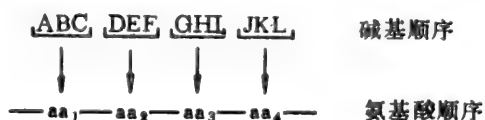
## 氨基酸由一个从固定点开始的三碱基组编码

遗传密码是指DNA (或其转录本RNA) 中碱基序列和蛋白质中氨基酸序列之间的相互关系。1961年, 克里克, F. (Francis Crick), 布伦纳, S. (Sydney Brenner) 等用实验确定了遗传密码的以下特征:

1. 编码比是多少? 因为DNA中只有四种碱基, 如果以一个碱基作为编码单元, 则只能为四种氨基酸编码。如果以二个碱基作为编码单元, 只能编码出十六种氨基酸 ( $4 \times 4 = 16$ ); 而以三个碱基为编码单元, 则能编码出六十四种氨基酸 ( $4 \times 4 \times 4 = 64$ )。蛋白质都是由二十种基本氨基酸组成的, 故从此简单计算, 说明可能需要三个或更多碱基为一个氨基酸编码。遗传实验进而肯定确实是三个碱基一组编码一个氨基酸。此三联碱基组即称为密码子。

2. 密码间是否有交搭? 三联体密码不交搭时, 每个三碱基组仅能特异地编码一个氨基酸, 若互相完全交搭, 则ABC编码第一个氨基酸, BCD编码第二个, CDE编码第三个, 依次第四个。

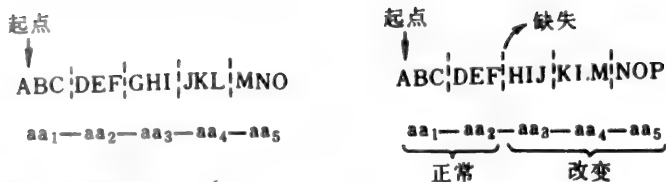
这些不同的可能性可用突变株中氨基酸顺序的测定加以鉴别。假设碱基C突变为C', 在不交搭密码中, 只有氨基酸1发生改变。在互相完全交搭的密码中, 氨基酸1, 2和3都会发生改变。测定烟草花叶病毒不同突变株外壳蛋白的氨基酸排列顺序, 发现一般只有一个氨基酸发生改变。同样, 我们记得在导常血红蛋白的讨论中 (第5章) 大多数变种也只有一个氨基酸发生改变。因此得出结论, 遗传密码是不交搭的。



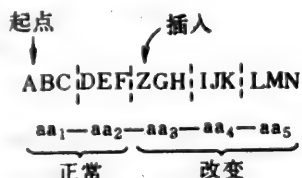
3. 三碱基组如何正确识读? 一种首选的可能性是四个碱基中的一个 (以Q表示) 在三碱基组间作为“逗点”:

...Q A B C Q D E F Q G H I Q J K L Q ...

事实证明并非如此。而碱基却是从一个固定的起点开始顺序识读的。其中并无逗点。若假设突变后缺失了碱基G: 在此多肽链中前二个氨基酸将是正常的, 但余下的碱基识读将发生错



误，因为缺失G使识读的框架发生了移动。若再假设在F和G之间增加了一个碱基Z。



这种增加突变也打乱了从氨基酸3密码子开始的识读框架。确实，从增加和缺失的各种突变重组的遗传学研究中也揭示出遗传密码的许多特征。

4. 前已述及，存在着六十四种可能的碱基三联体和二十种氨基酸。是恰好一种三联体对应于二十种氨基酸中的一种氨基酸，还是有些氨基酸由几种三联体编码？遗传学研究发现六十四种三联体中大多数起编码氨基酸的作用。随后生物化学的研究发现六十四种中有六十一一种三联体编码特定的氨基酸。因此，大多数氨基酸有几个编码。换言之，遗传密码是简并的。

### 遗传密码的解译：用人工合成的RNA作信使

六十四种密码和二十种氨基酸之间的相互关系是什么？原则上，这个问题可以从比较蛋白质中氨基酸的排列顺序和其相应基因或mRNA中碱基排列顺序得到直接的回答。但在1961年，这条途径在实验中是不可能的，因为当时基因和mRNA分子中的碱基排列顺序全然不知。因此遗传密码的解译当时看来不会有很快的突破，但情况突然发生了变化。尼伦伯格，M. (Marshall Nirenberg) 发现在无细胞蛋白质合成体系中加入多聚尿苷酸 (poly U) 后合成出了多聚苯丙氨酸。显然，poly U被用来作为信使RNA了。第一个密码就被解译出来了，UUU编码苯丙氨酸。这个杰出的实验指出了完全阐明遗传密码的途径。

让我们详细讨论一下这个带有里程碑性的实验。它的两个必需的组成是无细胞蛋白质合成体系和被用作为信使RNA的人工合成的多核苷酸。无细胞蛋白质合成体系是用以下方法从大肠杆菌中制备得到的。将细菌细胞与细粒状矾土一起轻轻研磨使破碎生成细胞液。离心除去细胞壁和细胞膜，这样获得的抽提液中含有DNA，mRNA，tRNA，核糖体，酶和其它细胞成分。当加入ATP，GTP和氨基酸时，此无细胞体系就可合成出蛋白质来。在加入的氨基酸中至少有一种是具有放射活性的，故可测出其掺入蛋白质的情况。将此混合体系在37℃保温约一小时。然后加入三氯醋酸中止反应并沉淀蛋白质，游离氨基酸则留在上清液中。沉

淀经洗涤后再计数测定其放射性以确定掺入新合成的蛋白质中的标记氨基酸量。此体系的关键特征是加入脱氧核糖核酸酶能中止蛋白质的合成,因为它破坏了合成新 mRNA 的模板 DNA。在加入脱氧核糖核酸酶时因原已存在的 mRNA 是不稳定的,所以几分钟后蛋白质合成就中止了。尼伦伯格发现,当加入粗制 mRNA 时蛋白质的合成又恢复了。因此,这是一个能对加入的 mRNA 起应答的无细胞蛋白质合成体系。

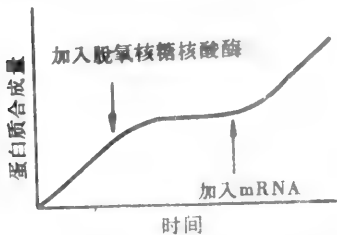


图 26-3 向无细胞体系中加入脱氧核糖核酸酶几分钟后,蛋白质合成就中止了,而在加入 mRNA 后随即又恢复。

此实验的另一个关键成分是人工合成的多核苷酸——poly U。polyU 是用多核苷酸磷酸化酶合成的,此酶由格伦伯格-马纳戈, M. (Marianne Grunberg-Manago) 和奥丘阿, S. (Severo Ochoa) 在 1955 年发现的。它催化由核糖核苷二磷酸合成多核苷酸:



此酶和 RNA 聚合酶催化的反应是完全不同的。在此反应中,活化的底物是核糖核苷二磷酸而不是三磷酸。产物之一是正磷酸而不是焦磷酸。故此反应不能由焦磷酸的水解而趋向右边。事实上,在体内此平衡趋向于 RNA 降解而不是合成的方向。一个关键的差别是多核苷酸磷酸化酶不需要模板。此酶催化合成的 RNA 的碱基组成受反应液中各种核苷酸比例的影响,且其排列顺序是随机的。因此,多核苷酸磷酸化酶是解译遗传密码的一个很有价值的实验工具。当此酶和高浓度的 UDP 一起保温时就可合成出多聚 U。而含二种核苷酸例如 U 和 A 的按随机排列的共聚多核苷酸就可利用此酶和 UDP 及 ADP 一起保温制得。

在无细胞蛋白质合成体系中加入不同的人工合成的多核苷酸,测定  $^{14}\text{C}$ -标记的 L-苯丙氨酸的掺入。其结果是引人瞩目的。

加入的多核苷酸	每分钟 $^{14}\text{C}$ 计数
无	44
多聚 A	50
多聚 C	38
多聚 U	39,800

将  $^{14}\text{C}$ -标记的不同氨基酸加入到各培养液中做同样的实验时,发现多聚 A 和多聚 C 分别导致多聚赖氨酸和多聚脯氨酸的合成。这样,三个密码被解译了出来。

密 码	氨 基 酸
UUU	苯丙氨酸
AAA	赖氨酸
CCC	脯氨酸

密码 GGG 不能用同样的方法来解译,因为多聚 G 不能被用作模板,可能的原因是多聚 G 形成了三股螺旋的结构。有广泛有序结构区存在的多核苷酸常不是合成蛋白质的有效模板。

利用各种共聚体为模板为许多氨基酸测出了密码子的碱基组成

用由二种碱基组成的各种共聚核糖核苷酸作模板来进一步揭示遗传密码。例如,在一个

由U和G随机排列组成的共聚体中，就可能有八种不同的三联体：UUU，UUG，UGU，GUU，UGG，GUG，GGU和GGG。在U和G的摩尔比为0.76和0.24的共聚体中，能很方便地计算出这些三联体密码各自出现的几率（表26-1）。表26-2列出了以它们作模板时测出

表26-1 在U (0.76)和G (0.24)的随机共聚体中  
各三联体预期出现的几率

三联体	几率	相对出现率
UUU	$.76 \times .76 \times .76 = .439$	100
UUG	$.76 \times .76 \times .24 = .139$	31.6
UGU	$.76 \times .24 \times .76 = .139$	31.6
GUU	$.24 \times .76 \times .76 = .139$	31.6
UGG	$.76 \times .24 \times .24 = .0438$	10.0
GUG	$.24 \times .76 \times .24 = .0438$	10.0
GGU	$.24 \times .24 \times .76 = .0438$	10.0
GGG	$.24 \times .24 \times .24 = .0138$	3.1

表26-2 经U (0.76)和G (0.24)的随机共聚体作  
用后氨基酸的掺入率

氨基酸	相对掺入量	推断密码子的组成
苯丙氨酸	100	UUU
缬氨酸	37	2U, 1G
亮氨酸	36	2U, 1G
半胱氨酸	35	2U, 1G
色氨酸	14	1U, 2G
甘氨酸	12	1U, 2G

不同氨基酸的掺入率。正如预期，苯丙氨酸掺入率最高，因为三联体密码UUU存在最多。缬氨酸、亮氨酸和半胱氨酸其次。它们的掺入率略大于苯丙氨酸掺入率的三分之一，这和按计算含二个U一个G的三联体出现的几率是一致的。其它氨基酸掺入都很少。因此得出了结论：缬氨酸、亮氨酸和半胱氨酸是由含有2个U和1个G的密码子编码，而色氨酸和甘氨酸是由含有1个U和2个G的密码子编码的。

还可利用其它随机排列的共聚体，如UA, UC, AC, AG和CG以及UGC, AGC, UAC和UAG作类似的实验。用此方法尼伦伯格和奥丘阿的实验室推断出了二十种氨基酸的相应密码子的碱基组成。

三核苷酸促进特异的转移RNA分子和核糖体的结合

用各种共聚物作模板揭示了各种氨基酸相应密码子的碱基组成但却不知它们的排列顺序(UUU, AAA和CCC除外)。如前所述，缬氨酸是由含2个U和1个G的三联体编码的。但它是UUG, UGU还是GUU呢？通过二个完全不同方式的实验回答了这个问题：(1)用人工合成的具有一定排列顺序的多核苷酸，和(2)依赖密码子的特异tRNA分子和核糖体的相互结合。

1964年，尼伦伯格发现在无蛋白质合成的情况下，三核苷酸能促进特异的tRNA分子与

核糖体结合。例如，加入pU pU pU 促进苯丙氨酸tRNA与之结合，pA pA pA 显著地促进赖氨酸tRNA与之结合，pC pC pC 促进脯氨酸tRNA与之结合。二核苷酸并不促进tRNA与核糖体的结合。此研究表明三核苷酸（正如 mRNA 上的三联体一样）特异地与其特定的 tRNA 结合，后者是由这些三联体编码的。他设计了一种简便快速的结合分析法：凡结合在核糖体上的tRNA分子在用硝化纤维素滤器过滤时能被截留下来，而未结合的tRNA能通过滤器。这种截留在滤器上的tRNA可通过负载有 $^{14}\text{C}$  标记的特异氨基酸进行鉴定。

用有机化学或酶学的技术合成了所有六十四种的三核苷酸。测定了每种三核苷酸对二十种氨基酸的相应tRNA分子结合的影响。发现pU pU pG 只促进亮氨酸tRNA和核糖体的结合。pU pG pU 只促进半胱氨酸tRNA的结合和pG pU pU 只促进缬氨酸tRNA的结合。因此得出结论：UUG, UGU 和GUU 分别是亮氨酸、半胱氨酸和缬氨酸的密码子。某些密码子不能促使任何tRNA被紧密结合，另一些密码子则能使几种tRNA被结合。但大多数密码子可得到明确的结合结果。事实上，大约五十种密码子就是通过这种简单而精细的实验方法解译出来的。

## 有确定顺序的共聚体也是破译密码的工具

大约同时，科拉纳，H.G. (H. Gobind Khorana) 成功地合成了一些有一定重复顺序的多核苷酸，用有机化学与酶学技术相结合的方法合成了各种含二、三、四个碱基的共聚体。让我们以多聚(GUA)为例看一下其合成的战略。此有序共聚体的排列顺序是

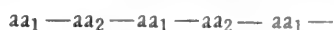


首先，科拉纳采用有机化学方法合成出了两条互补的、各有九个碱基的脱氧寡核苷酸链：d(TAC)<sub>3</sub>和d(GTA)<sub>3</sub>。以此两条寡核苷酸作模板，用四种脱氧核苷三磷酸经DNA聚合酶I催化合成了长链的DNA。两种脱氧寡核苷酸链中的任何一种都不能单独作为有效的模板。若两种脱氧寡核苷酸同时存在，则d(TAC)<sub>3</sub>是酶促合成多聚d(GTA)的模板，而d(GTA)<sub>3</sub>是合成多聚d(TAC)的模板。这些长而互补的DNA链即可形成双螺旋结构。下一步是要得到与多聚d(TAC)和多聚d(GTA)相应的多聚核糖核苷酸长链。这可用多聚d(TAC) - 多聚d(GTA) 双股作模板靠RNA聚合酶来完成。DNA双链中哪一条被转录可通过加入三种恰当的核糖核苷三磷酸来进行选择。当在保温体系中加入GTP、UTP和ATP时，可以从多聚d(TAC)模板链上合成出多聚(GUA)。另一条链因缺少必要的底物之一CTP而不能转录。当加入CTP、UTP和ATP时，多聚(UAC)即从另一条模板链上合成。因此通过有机合成，接着在模板指导下由DNA聚合酶催化，继之以RNA聚合酶催化的合成，就生成了两条具有确定重复顺序的多聚核糖核苷酸长链（图26-4）。

这些有规则的共聚体将在无细胞蛋白质合成体系中被用作为模板。让我们看一下某些结果。一个共聚体含有P和Q二种碱基交替排列的顺序，含有二个密码子PQP和QPQ。



因此，其多肽产物应含有由二种氨基酸（简写aa<sub>1</sub>和aa<sub>2</sub>）交替排列的顺序：



在多肽产物中究竟aa<sub>1</sub>还是aa<sub>2</sub>是其氨基末端，取决于读码框架起点在P还是Q。当多聚(UG)作模板时，就合成出由半胱氨酸(Cys)和缬氨酸(Val)交替排列的多肽。

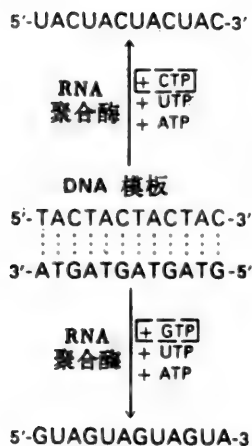


图26-4 双螺旋DNA模板上哪一条链被转录取决于在保温体系中  
选择加入的核糖核苷三磷酸。

UGU|GUG|UGU|GUG|UGU|GUG  
Cys—Val—Cys—Val—Cys—Val

此结果无疑地确定了密码是三联体，并且表明UGU或GUG编码半胱氨酸而其中另一种编码缬氨酸。当和上述tRNA结合实验的数据一起考虑时就可肯定是UGU编码半胱氨酸而GUG编码缬氨酸。另外的由二种碱基交替组成的几种共聚体合成出来的相应多肽是

模 板	产 物	密 码 子 组 成
多聚 (UC)	多聚 (丝氨酸-亮氨酸)	UCU→丝氨酸 CUC→亮氨酸
多聚 (AG)	多聚 (精氨酸-谷酰胺)	AGA→精氨酸 GAG→谷酰胺
多聚 (AC)	多聚 (苏氨酸-组氨酸)	ACA→苏氨酸 CAC→组氨酸

现在让我们考虑一个由三个碱基组成具有重复顺序的模板，多聚(PQR)。若读码框架起点于P，其产生的多肽中应只含有一种由三联体PQR编码的氨基酸：

起始  
↓  
PQR|PQR|PQR|PQR|PQR|PQR...  
aa<sub>1</sub>—aa<sub>1</sub>—aa<sub>1</sub>—aa<sub>1</sub>—aa<sub>1</sub>—aa<sub>1</sub>

但若读码框架起点于Q，合成出的多肽将含有另一种由三联体QRP编码的不同的氨基酸：

起始  
↓  
P|QRP|QRP|QRP|QRP|QRP|QRP...  
aa<sub>2</sub>—aa<sub>2</sub>—aa<sub>2</sub>—aa<sub>2</sub>—aa<sub>2</sub>—aa<sub>2</sub>

若读码框架起点于R，将合成出第三种多肽，含有唯一由三联体RPQ编码的氨基酸：

起始  
↓  
PQ|RPQ|RPQ|RPQ|RPQ|RPQ|RPQ...  
aa<sub>3</sub>—aa<sub>3</sub>—aa<sub>3</sub>—aa<sub>3</sub>—aa<sub>3</sub>—aa<sub>3</sub>

因此，预期的产物将是三种不同的均多肽。事实上，在许多由三种核苷酸组成并具有重复顺序的模板实验中也确实观察到这种现象。例如，多聚(UUC)引导合成得到多聚苯丙

氨酸、多聚丝氨酸。此结果，与其它实验结果一起表明，UUC 编码苯丙氨酸，UCU 编码丝氨酸和CUU 编码亮氨酸。其它按此类模板合成出来的相应多肽如表26-3。注意多聚(GUA)和多聚(GAU) 各只引导合成出二种而不是三种均多肽。其原因在下面即将得到澄清。

表26-3 用由三个核苷酸组成具重复顺序的信使合成出来的均多肽

信 使	合 成 出 的 均 多 肽
多聚 (UUC)	Phe, Ser, Leu
多聚 (AAG)	Lys, Glu, Arg
多聚 (UUG)	Cys, Leu, Val
多聚 (CCA)	Gln, Thr, Asn
多聚 (GUA)	Val, Ser
多聚 (UAC)	Tyr, Thr, Leu
多聚 (AUC)	Ile, Ser, His
多聚 (GAU)	Met, Asp

科拉纳也合成了几种含四核苷酸重复顺序的共聚物，例如多聚(UAUC)。此模板不论如何，都引导合成出具有酪氨酸-亮氨酸-丝氨酸-异亮氨酸重复顺序的多肽：

UAU|CUA|UCU|AUC|UAU|CUA|UCU|AUC

Tyr—Leu—Ser—Ile—Tyr—Leu—Ser—Ile

就从这个结果推断出了四种密码子的组成。

当用多聚(GUAA)作模板时，得到了一个完全不同的结果。其仅有的产物是二肽和三肽。为什么无更长的链呢？理由是在此多聚体中的一种三联体UAA，它不编码任何氨基酸而是指令蛋白质合成的终止。

GUA|AGU|AAG|UAA|GUA|A...

Val—Ser—Lys—终止

当用多聚(AUAG)作模板时也只合成出二肽和三肽，因为UAG是链终止的第二种信号：

AUA|GAU|AGA|UAG|AUA|G...

Ile—Asp—Arg—终止

现在让我们再看一下表26-3。以多聚(GUA)作模板时只能合成出二种而不是三种均多肽，因为第三种读码框架的相应序列是终止信号的重复序列。

G|UAG|UAG|UAG...

终止—终止—终止

多聚(GAU)怎样呢？以它作模板也只能合成出二种均多肽，因为第三种读码框架的序列

GA|UGA|UGA|UGA|U...

终止—终止—终止

UAA是又一种链终止的信号。事实上，UAG，UAA和UGA是仅有的三种不编码任何氨基酸的密码子。

科拉纳合成具有一定顺序的多核苷酸是一个杰出的成就。使用这些多聚体作为蛋白质合成的模板，加上尼伦伯格用三核苷酸促进tRNA和核糖体结合的研究，终于在1966年使遗传密码完全认识了，而这个结果在六年前还认为是一种不能实现的幻想。科拉纳设计的这种



有效的合成方法，也使另一个成就获得成功：一种与tRNA分子序列相应的DNA分子的全合成。

遗传密码的主要特征

所有六十四种密码子都已解译了出来(表26-4)。六十一一种三联体与特定的氨基酸相对应，而另三种是终止链的密码子。因为二十种氨基酸有六十一一种三联体为之编码，很显然密码是高度简并的。换言之，许多氨基酸由不止一种三联体编码。仅有色氨酸和甲硫氨酸只由一种三联体编码。其它十八种氨基酸由二种或多种三联体编码。事实上，亮氨酸、精氨酸和丝氨酸各由六种密码子编码。在正常生理情况下，密码不是双关的：一种密码子只决定一种氨基酸。

表26-4 遗传密码

第一位(5'端)	第 二 位				第三位(3'端)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	终止	终止	A
	Leu	Ser	终止	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

注：密码子中碱基序位如为已知，即可找出相应的氨基酸。例如，mRNA上密码子5' AUG 3'编码甲硫氨酸，而CAU编码组氨酸。UAA，UAG和UGA是终止信号。AUG既是一种起始信号，又编码肽链中的甲硫氨酸。

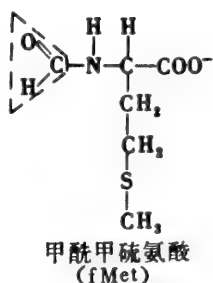
编码同一种氨基酸的几种密码子称同义词(同义密码子)。例如，CAU和CAC对组氨酸是同义词。注意同义词并不是杂乱地分布在遗传密码表上的(表26-4)。编码同一种氨基酸的二种或多种同义词划在同一格中(除非同义词多于四个)。同一格中氨基酸的密码子的第一、二位碱基相当，但第三位碱基不同，例如GUU，GUC，GUA和GUG。因此，大多数同义词的不同仅在于三联体的最后一个碱基。检查一下密码，可发现XYC和XYU总是编码同一种氨基酸，而XYG和XYA也总编码同一种氨基酸。当我们考虑tRNA分子上的反密码子性质时(506页)，这些密码子同义性的结构基础就会清楚了。

遗传密码广泛简并的生物学意义是什么？一种可能性是简并减少突变的有害效应。如果密码不简并，那末如二十种密码子标志氨基酸则就有四十四种密码子标志肽链合成的终止。如无简并存在，则造成终止突变的可能性要大大高于现有的。要知道重要的是，肽链终止的

突变常导致蛋白质的失活，而一个氨基酸被另一个氨基酸替换则相对地无害。密码简并的意义也可能是容许DNA中碱基组成有较大的改变而仍不改变由这DNA编码的蛋白质中氨基酸的排列顺序。细菌DNA的[G] + [C]含量的范围是小于30%至大于70%。若各种同义词得到一致地使用，则[G] + [C]含量相差很大的DNA分子也能编码出相同的蛋白质。

## 蛋白质合成的起始信号和终止信号

前已提及，UAA、UAG和UGA标志肽链的终止。这些密码子不是被tRNA分子而是被称为释放因子的特异蛋白质识别。蛋白质合成的起始信号则更复杂些。在细菌中多肽链起始于一种被修饰的氨基酸——甲酰甲硫氨酸(fMet)。fMet由一个特殊的tRNA携带。



此fMet-tRNA识别密码子AUG（少数情况下，GUG）。而AUG又是链内甲硫氨酸的密码子，同时GUG是链内缬氨酸的密码子。这意味着多肽链第一个氨基酸的信号较所有后面的更复杂。AUG（或GUG）仅是起始信号中的一部分。在AUG（或GUG）前面的一个信号决定它们是被识读为链的起始信号还是链内的甲硫氨酸（或缬氨酸）残基的密码子。蛋白质合成中的起始和终止机制将在下一章中讨论（512页）。

## 遗传密码的通用性

如前所述，遗传密码通过在细菌无细胞体系中用三核苷酸和人工合成mRNA模板所做的研究，已得到解译。但出现了二个问题：遗传密码在整体和离体是否一样？遗传密码是否在所有生物中都相同？经过突变病毒、细菌和高等生物的研究，此问题已得到了肯定的回答。从人血红蛋白基因突变，烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因突变和大肠杆菌色氨酸合成酶 $\alpha$ 链的基因突变中已了解到大量氨基酸被置换的情况。几乎所有的氨基酸被置换都可用一个碱基的突变来解释（表26-5）。这是全部遗传密码的正确性和通用性的最严格的验证。

为什么经过亿万年的生物进化，遗传密码一直保持不变呢？考虑一下如果一个突变使mRNA读码改变会出现什么样的结果？这样一个突变会改变这一有机体合成的大多数，即使不是全部蛋白质中氨基酸的排列顺序。这些改变多数无疑是有害的。故一定存在一个严格的选择性以阻止这种改变的发生。

表26-5 人血红蛋白, 大肠杆菌色氨酸合成酶和烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白的突变

蛋 白 质	氨 基 酸 置 换	推 断 密 码 子 变 化
血红蛋白	Glu→Val	GAA→GUA
血红蛋白	Glu→Lys	GAA→AAA
血红蛋白	Glu→Gly	GAA→GGA
色氨酸合成酶	Gly→Arg	GGA→AGA
色氨酸合成酶	Gly→Glu	GGA→GAA
色氨酸合成酶	Glu→Ala	GAA→GCA
TMV 外壳蛋白	Leu→Phe	CUU→UUU
TMV 外壳蛋白	Glu→Gly	GAA→GGA
TMV 外壳蛋白	Pro→Ser	CCC→UCC

• Glu→Val和Glu→Lys的置换分别发生在人血红蛋白S和血红蛋白C的β链第6位。

基因中碱基的顺序及其多肽产物中氨基酸的顺序具有线性对应性(共线性)

现在我们转向讨论基因和蛋白质的相互关系。本泽, S. (Seymour Benzer) 用高分辨率遗传图谱进行的研究揭示, 基因具有不分枝的结构。此重要结果和已确立的DNA由线性顺序的碱基对组成的事实相符。多肽链也具有不分枝的结构。因此, 早在本世纪六十年代就提出了以下的问题: 在基因及其多肽产物间是否存在着一个线性的对应关系?

亚诺夫斯基, C. (Charles Yanofsky) 采用能产生改变酶分子的大肠杆菌突变株来探索这个问题。他先分离出许多突变的色氨酸合成酶α链, 然后用转导噬菌体的重组实验测定了这些α链在遗传图上的位置。有些突变在遗传图上彼此很接近, 而另一些在同一基因内相距很远。第二个重要的工作是测定了这十种突变株中每种氨基酸置换的位置。首先, 测出了野生型酶α链中168个氨基酸残基的排列顺序。然后用指纹图谱测出了每种突变株中氨基酸被置换的位置和种类。遗传图谱中突变的次序与其多肽产物的相应氨基酸改变的次序是一致的。

(图26-5)。换言之, α链基因与其多肽产物间是线性对应的。

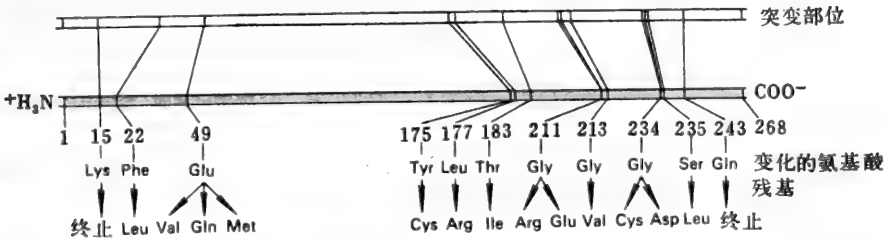


图26-5 色氨酸合成酶α链基因与氨基酸顺序间的共线性(线性对应性)。DNA上的突变位置(无色)用遗传图谱技术测定。氨基酸顺序中置换的氨基酸位置(网线)与相应的突变顺序是相一致的。[依据C. Yanofsky. Gene structure and protein structure. Copyright © 1967 by Scientific American, Inc.]

## 一些病毒DNA序列可编码几种蛋白质

$\phi$ X174 DNA所编码的蛋白质数比从其核苷酸含量预期的要多，这开始时令人费解。此病毒虽只有5,375个碱基，怎样编码出2,000多个氨基酸残基呢？这个问题从其全部的碱基顺序（462页）中得到了解答：从中得知 $\phi$ X174 DNA具有几个交搭基因。其mRNA转录本中有几个区域可用几种不同的读码框架进行翻译，因此产生了不同氨基酸排列顺序的蛋白质（图26-6）。例如，同样的300个核苷酸既编码基因E蛋白又同时编码基因D蛋白的大部分。

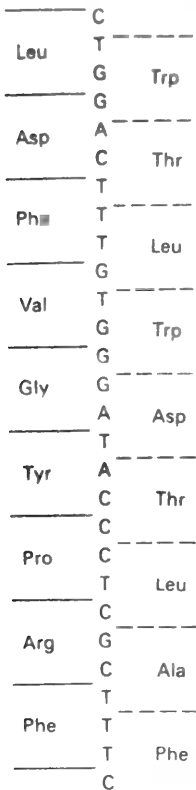
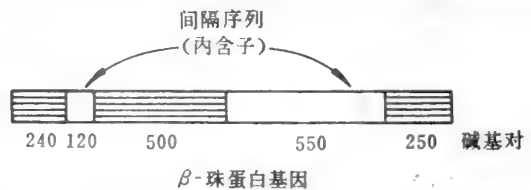


图26-6  $\phi$ X 174 DNA 中的交搭基因。由两种不同读码框架生成的二种氨基酸顺序示于碱基序列旁。

G4，一个有关的噬菌体提供了一个更绝对的例子，它具有可编码三种不同蛋白质的DNA短段。这些病毒通过基因交搭使其小分子DNA蕴藏着较多的信息。但是，也为遗传学上的经济付出了代价。由交搭基因编码的氨基酸序列是高度受限的。因此，交搭基因只在一个基因组中DNA量受到苛刻限制时才予应用，如在一个有固定蛋白质外壳的病毒中。

## 真核细胞基因由翻译的和 不翻译的DNA顺序镶嵌组成

在细菌中，多肽链是由DNA中连续排列的三联体密码子所编码的。多年来曾假设在高等生物中基因也是连续的。1977年，当几个实验室的研究者发现有些基因是不连续时，以上观点意外地被推翻了。例如，血红蛋白 $\beta$ 链的基因，其氨基酸编码序列就被一个含550个碱基对的长段和一个含120个碱基对的短段非编码间隔序列所间隔。故此 $\beta$ 珠蛋白基因被分隔成三个编码序列。



这种意外的结构是通过 $\beta$ 珠蛋白mRNA和含 $\beta$ 珠蛋白基因的小鼠DNA片段间的杂交电泳研究揭示的（图26-7）。先将DNA双链加以部分变性，使mRNA能与DNA互补链杂交。此时DNA单链区成环状并在电泳下呈一条细线；而双链DNA或DNA-RNA杂交链区相比之下就呈粗线状。假如 $\beta$ 珠蛋白基因是连续的，只能看到一个单环。但在电泳下此杂交体却明确地呈现三个环（图26-8），这表明此基因至少被一段DNA间隔着，此段无mRNA。存在间隔序列的其它证据是 $\beta$ 珠蛋白基因和 $\beta$ 珠蛋白mRNA的反向转录本的限制性内切酶图谱。这些图谱的明显不同表明基因组DNA在编码区间存在着非翻译序列，并同时确定了这

些序列的位置。

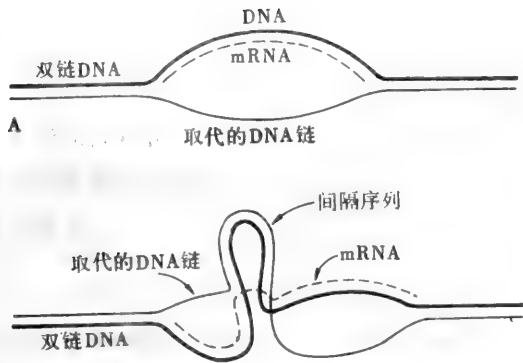


图26-7 用电镜检查间隔序列。一个mRNA分子(用虚线表示)杂交到含相应基因的基因组DNA上。(A)若基因是连续的,单链DNA可见一个单环。(B)若基因中有一个间隔序列,可见二个单链DNA环(细实线)和一个双链DNA环(细实线和粗实线)。

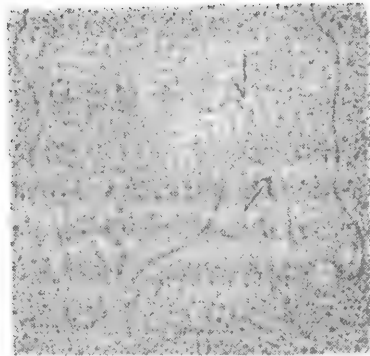


图26-8  $\beta$ -珠蛋白mRNA和含 $\beta$ -珠蛋白基因的DNA基因组间杂交体的电镜图。突出在结构外面的DNA双螺旋粗环是无相应mRNA的DNA中的间隔序列(如图26-7B)。上面箭头指示大的间隔序列,下面箭头指示小的间隔序列。[蒙Dr. Philip Leder特许。]

在基因表达的哪一阶段切除间隔顺序呢?从细胞核中分离到的新合成的RNA链要比从它衍生的mRNA分子大得多。事实上,从 $\beta$ -珠蛋白基因转录出的初级转录本含有二个非翻译区。在15S的初级转录本上,这些间隔顺序被切除,同时编码顺序被一精确的拼接酶连接起来形成成熟的9SmRNA(图26-9)。此分隔基因的编码顺序称外显子(对表达区),而非翻译的间隔顺序称内含子。

鸡卵清蛋白基因是另一种分隔的真核细胞基因,它由被七个长的内含子分隔开来的八个外显子组成(图26-10)。更令人瞩目是伴清蛋白基因,它至少含有十七个外显子。这类基因表达的共同特征是在mRNA中外显子按DNA中相同的顺序排列的。因此,分隔基因和连续基因相同,都和它们的多肽产物线性对应。

迄今已经谱图的所有鸟类和哺乳类的基因,除组蛋白基因外(546页)都是分隔的。为什么几乎所有高等生物真核细胞的基因都含有间隔顺序呢?一种可能性是分隔基因反映了进化的过程。外显子可能相当于折迭的

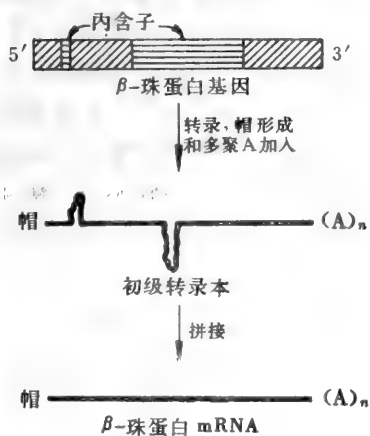


图26-9  $\beta$ -珠蛋白基因的转录和RNA初级转录本上间隔顺序的切除。帽的形成和多聚A的加入将在29章中讨论(551页)。

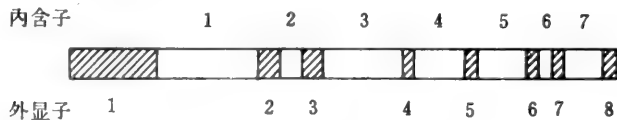


图26-10 鸡卵清蛋白基因结构。内含子(非编码区)无色,外显子(翻译区)用斜线表示。

单位或功能域,它们聚集在一起可产生具有新颖性质的蛋白质。另一种可能性是切除间隔顺序

以调控mRNA从细胞核向胞浆的转移。依据这一理论，初级转录本的拼接在决定细胞生成哪种蛋白质中起着关键的作用。在高等生物中分隔基因的发现开辟了一个新而诱人的探索领域，它可能在了解细胞的生长和分化中起重要的作用。

### 突变是由于DNA上碱基顺序的变动而产生的

有几种类型的突变：(1)一个或几个碱基对的置换；(2)一个或几个碱基对的缺失；和(3)一个或几个碱基对的插入(图26-11)。一个碱基对被另一个碱基对置换是最常见的突变方式。对T4噬菌体而言，每个碱基每次复制时的自发突变率估计为 $1.7 \times 10^{-8}$ 。大肠杆菌和果蝇的相应数值分别是 $4 \times 10^{-10}$ 和 $7 \times 10^{-11}$ 。

There have been no problems in St. Louis created by pre-trial publicity because the newspapers have exercised sound judgment and restraint in what they have printed.

—St. Louis Globe-Democrat.  
置换

In analyzing the pictures relayed by the Mariner 10 spacecraft en route to Mercury, the scientists said the planet becomes much more dramatic looking when viewed through an ultra-violet lens.

—Boston Globe.

插入

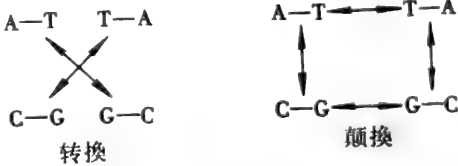
"I can speak just as good nglish as you," Gorbulo corrected in a merry voice.

—Seattle Times.  
缺失

Tomorrow: "Give Baby Time to Learn to Swallow Solid Food."  
etaoin-oshrdlucmfwypvbgkq

—Youngstown (Ohio) Vindicator.  
无意义

单一碱基对置换的方式有二种。一种是转换，即一个嘌呤被另一个嘌呤或一个嘧啶被另一个嘧啶置换。相反，颠换是一个嘌呤被一个嘧啶或一个嘧啶被一个嘌呤置换。



沃森和克里克在他们关于DNA双螺旋的经典文章中提出了自发转换发生的机制。他们注意到四种碱基中每个都有一些氢原子可以变换其位置。这种互变异构形式虽然发生率不高，但却可形成非A-T和非G-C的碱基对。例如，腺嘌呤的亚氨基异构体能和胞嘧啶配对(图26-12)。在下一轮复制时，此腺嘌呤又可能以其正常异构体形式与胸腺嘧啶配对，而胞嘧啶与鸟嘌呤配对。因此，在一个子代DNA分子中会由G-C碱基对替代A-T碱基对(图26-13)。

图26-11 突变的类型，用印刷错误示范。[引自S. Benzer, *Harvey Lectures*, Ser. 56 (Academic Press, 1961), p. 3.]

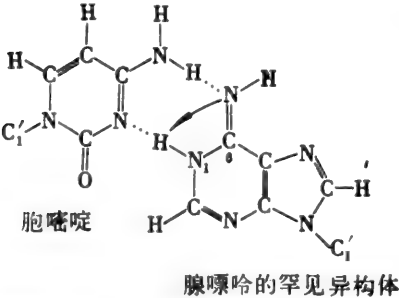


图26-12 腺嘌呤的罕见异构体与胞嘧啶而不是与胸腺嘧啶配对。此异构体是6-氨基基团上的质子转移到N-1位上生成的。

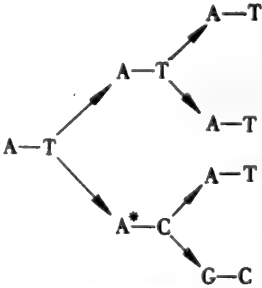


图26-13 罕见的腺嘌呤异构体(A\*)与胞嘧啶配对导致下一代G-C碱基对的生成。

突变也可因DNA聚合酶的缺陷而产生。有一种大肠杆菌的突变株，其突变率比正常大肠杆菌高上4倍，这可能是由于聚合酶的变异。这种生物的多种突变的特征几乎都是由A-T变成C-G的颠换所致。

### 一些化学诱变剂是相当特异的

碱基的类似物如5-溴尿嘧啶和2-氨基嘌呤能掺入DNA。当它们掺入DNA时或在下一轮复制中，可由于碱基配对的改变而造成转换（图26-14）。胸腺嘧啶的类似物5-溴尿嘧啶，正常地与腺嘌呤配对。但5-溴尿嘧啶的烯醇型异构体的百分数要比胸腺嘧啶的高，可能由于C-5上的溴原子比甲基具有较高的负电性。5-溴尿嘧啶的烯醇型可与鸟嘌呤配对，因此导致A-T  $\leftrightarrow$  G-C的转换。2-氨基嘌呤正常地与胸腺嘧啶配对。但与腺嘌呤不同，2-氨基嘌呤的正常异构体却能与胞嘧啶形成一个氢键。因此2-氨基嘌呤可造成A-T  $\leftrightarrow$  G-C的转换。

其它诱变剂的作用是对DNA上的碱基进行化学修饰。例如，亚硝酸能与含有氨基的碱基作用。腺嘌呤被氧化脱氨生成次黄嘌呤，胞嘧啶生成尿嘧啶和鸟嘌呤生成黄嘌呤。次黄嘌呤与胞嘧啶而不是和胸腺嘧啶配对。尿嘧啶与腺嘌呤而不是和鸟嘌呤配对。黄嘌呤和鸟嘌呤一样，与胞嘧啶配对。这样，亚硝酸导致A-T  $\leftrightarrow$  G-C的转换。羟胺（ $\text{NH}_2\text{OH}$ ）是一种高度特异的诱变剂，它几乎只与胞嘧啶反应生成一种衍生物，后者与腺嘌呤而不是和鸟嘌呤配对。羟胺引起一个单向的从G-C到A-T的转换。

另一类诱变是由扁平状的芳香族分子例如吡啶类引起的。这些化合物嵌入DNA中——即嵌入到DNA双螺旋中相邻的碱基之间（479页）。嵌入剂似乎是稳定了重复顺序如CGCGCGCG中变动了的碱基配对，因而导致一个或多个碱基对的插入或缺失。除非插入或缺失的是三整数个碱基或其倍数，否则这些突变的效应将是改变读码框架。事实上，正是对这些突变株的分析揭示了遗传密码的三联体性质。

### 通过对细菌的诱变作用检出多种潜在的致癌物质

人类的多种肿瘤是由于接触有毒的化学物质而引起的。这些化学致癌物常是诱变剂，这提示DNA损伤是致癌和突变的基础。因此识别这些化合物并确定它们作用的强度，以便减少人们与它们的接触，就十分重要了。艾姆斯，B. (Bruce Ames) 设计了一种检测化学诱变剂的简易敏感试验。在北特利培养皿的薄层琼脂上接种 $10^9$ 个特殊试验用的沙门氏菌株。这些细菌由于合成组氨酸的一个基因发生了突变因此在无组氨酸存在时不能生长。在培养皿中央加入诱变剂可诱发许多新的突变。其中一小部分是使原来的突变逆转，从而又能合成组氨酸。在无外源组氨酸时，这些逆转株在平板上经37℃保温二天后繁殖出了清晰的菌落（图26-15）。

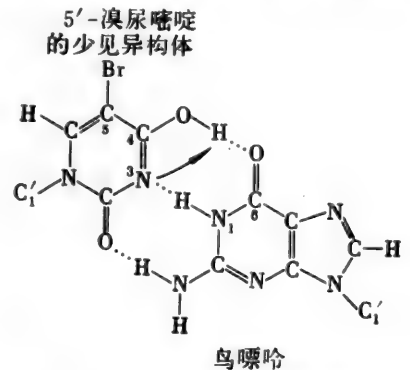


图26-14 胸腺嘧啶类似物5-溴尿嘧啶偶尔与鸟嘌呤而不是与腺嘌呤配对。C-5位上的溴的存在使质子从N-3转移到C-4的氧原子上，从而倾向形成较多的少见异构体。

例如，在无诱变剂时只有30个自发的逆转，当加入0.5微克2-氨基蒽时可生成11,000个逆转的菌落。用一系列浓度的化合物做试验可得到一个剂量效应曲线。其关系常呈线性，这说明突变的发生并不存在一个浓度阈值。

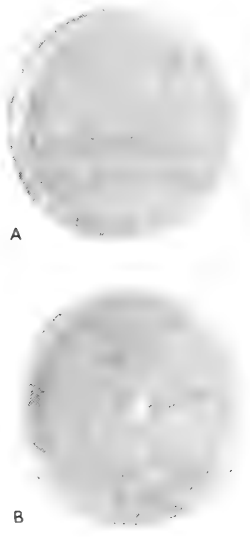


图26-15 诱变剂的沙门氏菌试验：(A)比特利培养皿中含约 $10^9$ 个不能合成组氨酸的细菌；(B)加入一片含有诱变剂的小圆滤纸，导致生成大量可合成组氨酸的逆转株。逆转株使纸片周围出现了一圈菌落。在A中见到的少数菌落是自发的逆转。[引自B. N. Ames, J. McCann, and E. Yamasaki, *Mutation Res.* 31 (1975) : 347.]

某些试验菌株对碱基对置换敏感，另一些则能检出碱基对的缺失或增加（框架移位）。为了提高这些特别设计菌株的敏感度，可用遗传方法使其切补修复系统缺失。同时它们还缺少正常时包裹在沙门氏菌表面的脂多糖屏障。缺失这种屏障有利于潜在诱变剂的掺入。此检测系统的另一个重要特征是需要加入哺乳动物的肝匀浆。我们记得肝或哺乳动物其它组织的酶系可使潜在的致癌物质转变成其活性形式（364页）。因细菌缺乏这些酶，所以于培养皿中需加入数毫克肝匀浆以活化这类诱变剂。例如，一个具有活性侧链（使它能与DNA形成一个共价键）和一个芳香环区域（使它能嵌入）的化合物要比一个仅有芳香环区域的化合物具有更强的诱变作用。

沙门氏菌试验现已被广泛应用于协助评价一大批化学物质的致突变和致癌的危险性。诱变物的这种细菌检测法快速而经济，补充了流行病学调查和费力、费时和费钱的

动物试验。诱变物的沙门氏菌试验是研究细菌中基因-蛋白质相互关系的一个副产品。在此我们看到了一个分子生物学的基础研究直接导致了公共卫生上重大进展的一个显著实例。

概 要

基因上碱基的顺序是和其多肽产物上氨基酸的顺序线性对应的。遗传密码就是DNA（或其转录本RNA）中的碱基顺序和蛋白质中氨基酸顺序间的关系。氨基酸是由从一个固定点开始的三碱基组（称密码子）编码的。六十四种密码子中的六十一一种特异地编码氨基酸，而另外三种密码子（UAA, UAG和UGA）是肽链终止的信号。因此，大多数氨基酸有多种的密码。换言之，密码是简并的。编码同一种氨基酸的几种密码子称同义密码。大多数同义密码只在三联体中最后一个碱基上有不同。一些病毒DNA序列可编码几种蛋白质，因为它们的转录本是用不同的读码框架翻译的。

遗传密码在所有生物界皆相同。它们是由三类实验解译出来的。首先，在发现了多聚尿苷酸编码多聚苯丙氨酸后，采用了在无细胞蛋白质合成体系中以人工合成的多核苷酸（由多核苷酸磷酸化酶催化生成）用作mRNA的办法。其次，发现一个核苷酸三联体（类似mRNA上的密码子）与具有相应的反密码的tRNA能作特异结合。于是人工合成了所有六十四种核



苷酸三联体；并测定了它们对相应tRNA与核糖体结合的促进能力。第三，用人工合成的具有已知重复顺序的多核苷酸作为mRNA。例如，多聚(UAUC)引导合成出多聚(酪氨酸-亮氨酸-丝氨酸-异亮氨酸)。

大多数高等真核细胞的基因是不连续的。在这些分隔基因中的编码顺序(外显子)被间隔顺序(内含子)分隔着，后者在初级转录本转变成mRNA时被切除。例如，哺乳动物 $\beta$ -珠蛋白基因有二个内含子。分隔基因和连续基因一样，与其多肽产物是线性对应的(共线性)。

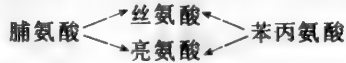
突变是由于DNA中碱基顺序发生改变而引起的。其主要形式是置换、缺失和插入。一个碱基对被另一个碱基对置换是最常见的突变形式。一个嘌呤被另一个嘌呤或一个嘧啶被另一个嘧啶置换称转换。一个嘌呤被一个嘧啶置换或反之称颠换。突变可因一个碱基的自发异构化或由于碱基类似物(如5-溴尿嘧啶)或其它化学诱变物(如亚硝酸)的作用而发生。许多潜在性的致癌物可通过其对细菌的诱变作用而查出。

## 习 题

1. 由mRNA分子中的以下碱基顺序编码的氨基酸顺序是怎样的？假定读码框架从5'端开始。

5'-UUGCCUAGUGAUUGGAUG-3'

2. 在无细胞蛋白质合成体系中加入多聚(UUAC)后合成出的多肽顺序是怎样的？
3. 假定在烟草花叶病毒的单链RNA经化学诱变剂处理后获得的突变株的特定点上，脯氨酸突变成丝氨酸或亮氨酸；这些突变株再用同一诱变剂处理后该点变成了苯丙氨酸。



- (a) 这四种氨基酸的可能密码子是什么？
- (b) 这一诱变剂是5-溴尿嘧啶、亚硝酸还是吡啶染料？
4. 一位蛋白质化学家告诉一位分子遗传学家说他发现了一种新血红蛋白变种，其中的赖氨酸被天冬氨酸置换了。分子遗传学家十分惊讶并请其朋友速回实验室。
  - (a) 为什么分子遗传学家对所说的氨基酸置换表示怀疑？
  - (b) 对分子遗传学家来说哪一种氨基酸置换较为可信？
5. 野生型T4噬菌体及其一个突变株的溶菌酶中的一部分氨基酸顺序如下：

	野生型									
	.....									
	-Thr-Lys-	Ser	-Pro-	Ser	-Leu-	Asn-	Ala	-Ala-	Lys-	
	.....									
	-Thr-Lys-	Val	-His-	His	-Leu-	Met-	Ala	-Ala-	Lys-	
	突变株									

- (a) 此突变株的出现是否由于T4DNA的一个碱基对发生了改变？若不是，此突变株是怎样产生的？
- (b) 在突变株和野生型中有五个不同的氨基酸，为它们编码的mRNA的碱基顺序是什么？
6. G4噬菌体DNA中一个区域的RNA转录本含5'-AAAUGAGGA-3'顺序，此区域编码三种不同的蛋白质，它们的氨基酸顺序是什么？

另外的习题，参阅W. B. Wood, J. H. Wilson, R. M. Benbow, and L. E. Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch. 19.

## 第27章 蛋白质合成

从上一章, 我们已知蛋白质中氨基酸的顺序是经tRNA分子读码而由mRNA上密码子的顺序决定的。现在我们转而讨论蛋白质合成的机制, 一个称之为翻译的过程。因为核酸中由四种碱基对字母组成的语言转变成了蛋白质中由二十种氨基酸字母组成的语言, 因此可以想象, 翻译是一个比DNA复制或转录更为复杂的过程, 因为复制和转录是在共同的碱基对语言范畴内进行的。事实上, 翻译过程需要一百多种的大分子相互协调。除核糖体外尚需要转移RNA分子、活化酶、可溶性因子和mRNA参加。

在详述细节之前, 先看一下蛋白质合成的总过程。蛋白质合成的方向是从氨基端到羧基端, 顺序地把氨基酸加到增长着的肽链的羧基端。其活化前体是各种氨基酰-tRNA, 其中氨基酸的羧基连在tRNA的3'-末端。氨基酸与其相应tRNA的连接由氨基酰-tRNA合成酶催化。此活化反应与脂肪酸活化类似, 由ATP驱动。对每一种氨基酸, 至少有一种tRNA和活化酶。蛋白质合成分三个阶段: 起始、延长和终止。起始是起始tRNA与mRNA上起始信号的结合。起始tRNA占据了核糖体的P位(肽酰部位); 核糖体上共有二个能与tRNA结合的部位。当又一个氨基酰tRNA结合到称A位(氨基酰部位)的另一核糖体上的tRNA部位时延长就开始了。于是新进入的氨基酰-tRNA上的氨基就和由起始tRNA携带的甲酰甲硫氨酸的羧基间形成一个肽键。生成的二肽酰-tRNA就从A位移到P位, 同时另一分子tRNA就从核糖体上脱落下来。氨基酰-tRNA的结合, 肽酰-tRNA从A位移到P位和伴随着的mRNA移动到下一个密码子都需要GTP的水解。然后一个氨基酰-tRNA结合到空出的A位上再开始延长的第二个循环, 其过程如同上述。当mRNA上的终止信号被一个蛋白质释放因子识读后即发生终止, 从而导致完成的多肽链从核糖体上释放出来。本章将主要讨论大肠杆菌中蛋白质的合成, 因其过程已比较清楚。后一章再讨论原核细胞和真核细胞蛋白质合成中的一些差别(554页)。

### 氨基酸由特异的合成酶活化并连接到转移RNA上

一个氨基酸的氨基和另一个氨基酸的羧基间要形成肽键在热力学上是困难的。但此热力学上的屏障可经前体氨基酸上羧基的活化而克服。蛋白质合成中的活化中间体是氨基酰酯, 即氨基酸的羧基与tRNA的3'末端核糖单位上2'-或3'-羟基经酯化连接。氨基酰基能在2'-和3'-羟基间迅速转换。此活化中间

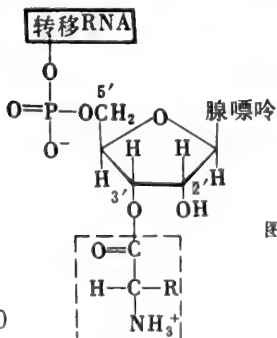


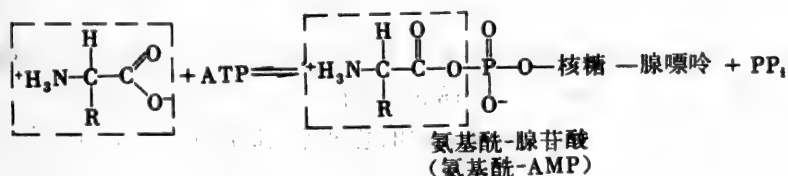
图27-1 在氨基酰-tRNA中, 氨基酸与末端腺苷的2'-或3'-羟基酯化。

体称氨基酰-tRNA(图27-1)。

氨基酸和tRNA连接的重要性不仅在于

活化了氨基酸的羧基使它能生成肽，也由于氨基酸本身不能识别mRNA上的密码子。确切地说，氨基酸是由特异的tRNA分子携带到核糖体上并由tRNA去识别在mRNA上的密码子的，因此tRNA分子起着接合器的作用。

1957年，赞姆克尼克，P. (Paul Zamecnik) 和霍格兰德，M. (Mahlon Hoagland) 发现，氨基酸的活化和以后连接到各种tRNA上受特异的**氨基酰-tRNA合成酶**的催化，此酶亦称**活化酶**。对某些合成酶，作用的第一步则是由氨基酸和ATP作用生成**氨基酰-腺苷酸**。这种活化物是氨基酸的羧基和AMP的磷酸基连接生成的混合酸酐。另一些合成酶虽催化ATP、氨基酸和tRNA反应，但测不到氨基酰-腺苷酸中间物的生成。



下一步是氨基酰-AMP上的氨基酰基转移到tRNA分子上，形成**氨基酰-tRNA**，这是蛋白质合成中的活化中间体。至于氨基酰基团是转移到tRNA的3'-末端核糖单位的2'-还是3'-羟基上则各种生物不同。但此活化的氨基酸能在2'-和3'-羟基间迅速转移。



活化和转移步骤的总结结果是：



此反应的 $\Delta G^\circ$ 接近0，因为氨基酰-tRNA酯键水解的自由能和ATP末端磷酸基水解的自由能相似。那么是什么因素驱动氨基酰-tRNA合成呢？正如预计，该反应由焦磷酸的水解所驱动。此三步反应的总结结果是大量放能。



因此，合成一个**氨基酰-tRNA**消耗二个高能磷酸键。其中一个消耗在氨基酰-tRNA酯键的生成上，另一个消耗在推动此反应向右进行。

氨基酸的活化和转运是由同一个**氨基酰-tRNA合成酶**催化的。事实上，**氨基酰-AMP**中间物并不从合成酶上游离出来，而是以非共价形式和酶的活性中心紧密结合。氨基酰-AMP通常是氨基酰-tRNA合成中的短暂中间物，但它十分稳定，当反应混合物中不含tRNA时，即容易被分离出来。

在脂肪酸活化中已知有酰基-腺苷酸中间物存在(294页)。有趣的是伯格，P. (Paul Berg) 首先在脂肪酸活化中发现了这中间物，继而又认识到它在氨基酸活化中也生成。这些反应的主要不同点是酰基的受体是辅酶A而氨基酰的受体是tRNA。这些生物合成在能力学上亦非常相似：两者都由于焦磷酸的水解而不可逆。

每种氨基酸至少有一种**氨基酰-tRNA合成酶**。这些酶在大小，亚基结构和氨基酸组成上是不同的(表27-1)。

表27-1 一些氨基酰-tRNA合成酶的性质

来 源	氨基酸特异性	质量 (kdal)	亚 基 结 构
大肠杆菌	组 氨 酸	85	$\alpha_2$
大肠杆菌	异亮氨酸	114	一条链
大肠杆菌	赖 氨 酸	104	$\alpha_2$
大肠杆菌	甘 氨 酸	227	$\alpha_2 \beta_2$
酵 母	赖 氨 酸	138	$\alpha_2$
酵 母	苯丙氨酸	270	$\alpha_2 \beta_2$
牛 胰 腺	色 氨 酸	108	$\alpha_2$

蛋白质合成的忠实性依赖于氨基酰-tRNA  
合成酶的高度特异性

遗传信息的正确翻译依赖于氨基酰-tRNA合成酶的高度特异性。此酶在识别将要活化的氨基酸和相应的受体tRNA上皆有高度的选择性。即将看到，接受不同氨基酸的tRNA分子有不同的碱基顺序，故易被合成酶识别。对这些酶更高的要求是去辨别相似的氨基酸。例如，异亮氨酸和缬氨酸唯一的不同是异亮氨酸多一个亚甲基（图27-2）。多出的亚甲基（—CH<sub>2</sub>—）提供的结合能使异亮氨酸比缬氨酸的活化容易200倍。体内缬氨酸的浓度是异亮氨酸的5倍，故缬氨酸代替异亮氨酸被错误掺入的几率是四十分之一。但在体内观察到的错误掺入率只有三千分之一，这表明随后一定有一校正步骤来提高其忠实性。事实是，合成酶校正了自己的错误。缬氨酸如被错误地活化后也不可能转移到特异于异亮氨酸的tRNA上。相反，此tRNA促进缬氨酸-AMP的水解，从而避免其错误地掺入蛋白质中。同时，此水解反应使合成酶解脱出来去活化和转运正确的氨基酸异亮氨酸。那末合成酶怎样避免水解其正常的中间物异亮氨酸-AMP呢？最可能的解释是其水解部位的大小正好容纳缬氨酸-AMP而如果异亮氨酸-AMP进入就嫌太小了。

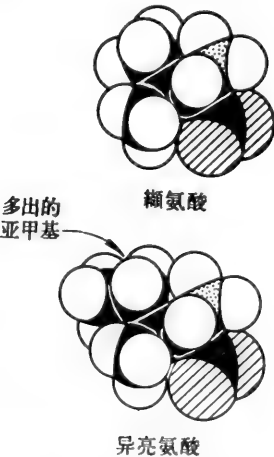


图27-2 缬氨酸和异亮氨酸的分子模型。标出了异亮氨酸多出的一个亚甲基。对此氨基酸特异的合成酶具有高度的分辨力。

其它一些氨基酰-tRNA合成酶除有合成部位外也还有水解部位。这些部位的功能可能是一个叠加的筛网以保证高度的忠实

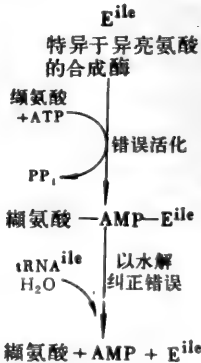
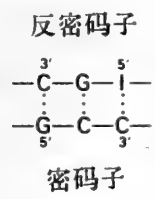


图27-3 水解校正。

性。合成部位抵制比特异氨基酸大的氨基酸,水解部位则分解比特异活化中间物小的中间物。可明显看出,蛋白质合成的高度忠实性严格地决定于许多氨基酰-tRNA合成酶的水解校正作用(图27-3)。

### 转移RNA分子具有统一的设计

1965年,霍利, R. (Robert Holley) 第一个测出了转移RNA分子的碱基顺序。这是他七年努力工作的成就。事实是,酵母丙氨酸tRNA的研究第一次提供了一个核酸分子的完整顺序。此工作是洞悉tRNA分子的生物学活性的开端。在揭示其碱基顺序时,霍利也创造了一个测定核酸顺序的一般技术。图27-4是酵母丙氨酸tRNA的顺序。其分子是含有七十六个核苷酸的一条单链。5'-端是磷酸化的(pG),而3'-端有一个游离的羟基。此分子的特征是含有较多非A、U、G和C的碱基。这个tRNA含有九个稀有核苷:次黄嘌呤核苷,假尿苷,二氢尿嘧啶核苷,胸腺嘧啶核苷和鸟嘌呤核苷与次黄嘌呤核苷的甲基衍生物。氨基酸连接的部位是此分子3'端腺苷残基的3'-羟基。在分子中间的IGC序列为反密码子。它与丙氨酸的一个密码子GCC互补。



随后不久,其它几种tRNA分子的顺序也测定了出来。现在已知顺序的有七十多种。引入注目的发现是所有的序列都可写成三叶草形,其中约一半的残基形成碱基对。因此,tRNA分子有许多共同的结构特征。这点也不奇怪,因为所有tRNA分子都几乎以相似的方式和核糖体及各mRNA起作用。确切地说,所有tRNA分子必需能符合核糖体的A位和P位并且必需都能和催化肽键生成的酶起作用。

- 所有转移RNA分子有如下共同的特征:
1. 它们是单链,各含有**73到93个核苷酸**(约25kda)。
  2. 它们含有许多稀有残基,典型的是每分子含有7到15个。大多数稀有残基是A,U,C和G的甲基或二甲基衍生物,由酶对tRNA前体修饰后生成(477页)。这些稀有碱基的作用尚未肯定。一种可能性是甲基化可避免某些碱基对的生成,因此使这些碱基得以参于其它

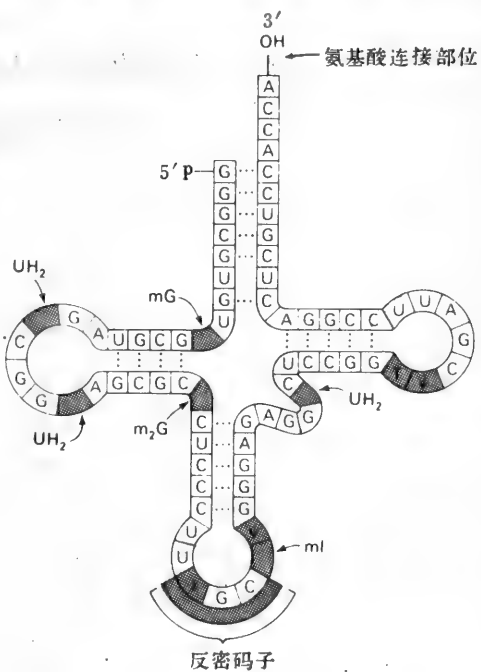


图27-4 酵母丙氨酸tRNA碱基顺序。修饰核苷(以网线表示)缩写如下:次黄嘌呤核苷(I),甲基次黄嘌呤核苷(mI),二氢尿嘧啶核苷(UH<sub>2</sub>),胸腺嘧啶核苷(T),假尿苷(ψ),甲基鸟嘌呤核苷(mG)和二甲基鸟嘌呤核苷(m<sub>2</sub>G)。

的作用。也可能甲基化使tRNA的某些部位具有更强的疏水性，这或许对它与合成酶和核糖体上蛋白质相互作用是重要的。

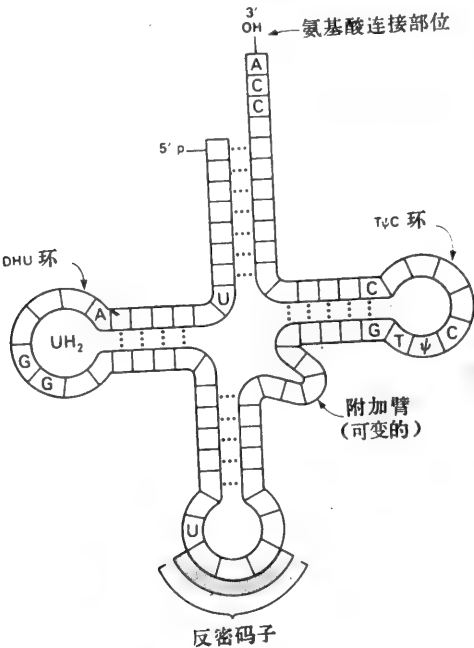
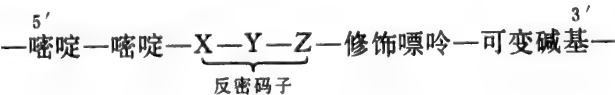


图27-5 tRNA分子的共同特征。

3. tRNA的5'端是磷酸化的。此5'端残基常为pG。
4. tRNA的3'端碱基顺序是CCA。活化的氨基酸即接在此末端腺苷的3'-羟基上。
5. tRNA中约半数核苷酸通过碱基配对形成双螺旋。五组碱基不形成碱基对：3' CCA末端区；TψC环，它得名于胸腺嘧啶核苷-假尿苷-胞嘧啶核苷顺序；“附加臂”，它所含的残基数多少不等；DHU环，它含有几个二氢尿嘧啶残基；和反密码环。
6. 反密码环含7个碱基，具有以下顺序：



### 转移RNA呈L形

由于里奇，A. (Alexander Rich) 和克卢格，A. (Aaron Klug) 的实验室所做的x射线结晶学研究，一个tRNA分子的三维结构已经在原子水平上得到了精确的了解。他们各自对酵母苯丙氨酸tRNA所作的x射线分析提供了丰富的结构信息：

1. 这个分子是L形的 (图27-6)。
2. 有两段双螺旋。每一螺旋约有10个碱基对，相当于一圈螺旋。两螺旋段彼此垂直，使分子具L形。根据顺序分析，在三叶草模型中表征的碱基配对是正确的。

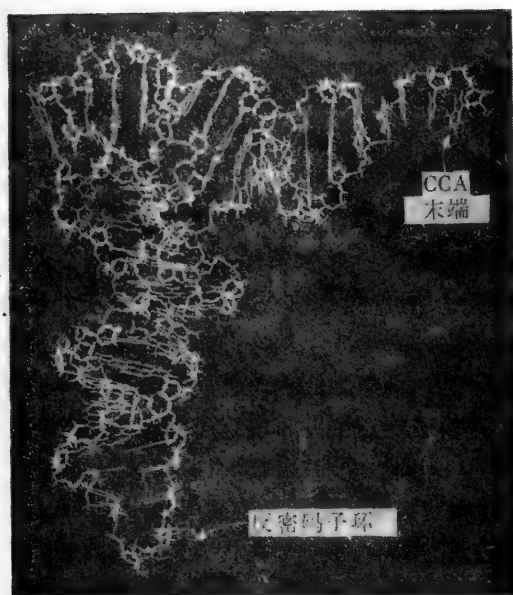


图27-6 酵母苯丙氨酸tRNA的骨架模型照像。根据3 Å分辨率的电子密度图数据。[承蒙Dr. Sung-Hou Kim 特 许。]

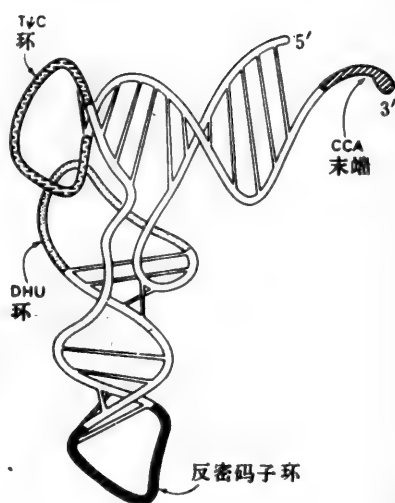


图27-7 酵母苯丙氨酸tRNA的三维空间结构图示。  
[依据Dr. Sung-Hou Kim 惠赠图。]

3. 非螺旋段的大部分碱基参与不寻常形式的氢键形成作用。这种第三类的相互作用存在于不互补的碱基之间(如G-G, A-A和A-C)。而且,核糖-磷酸骨架和某些碱基甚至和同一骨架的另一区亦有相互作用。在许多此类作用中,核糖单位的2'-羟基可作为氢键的供体或受体。另外,大部分的碱基是上下叠起的。这些相邻芳香环间的疏水性相互作用在稳定分子结构上起着十分重要的作用。

4. 含有氨基酸连接部位的CCA末端处于L形的一头。L形的另一头是反密码子环。因此在氨基酰-tRNA上氨基酸和反密码子相距较远(约80 Å)。DHU环和TψC环组成了L形的转角。

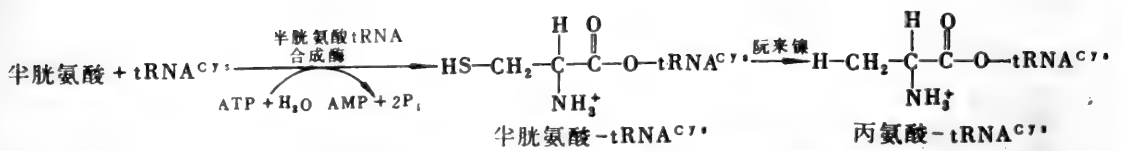
5. CCA末端与相邻的螺旋区和分子的其余部分没有很强的相互作用。分子的这一部分在氨基酸活化和在核糖体上进行蛋白质合成时,会发生构象的变化。

tRNA的三维空间结构的测定对用精确的分子词汇来阐明翻译的过程是十分重要的一步。在不多几年前,这个成就还被认为是一个遥远的可能性。而现在这个领域工作者的设想及努力已转向了更艰巨的目标,例如了解tRNA-合成酶复合体的三维空间结构以至结合在mRNA及核糖体蛋白质上tRNA的空间结构。

### 密码子由反密码子而不是由活化氨基酸进行识别

前已述及,tRNA上的反密码子是对mRNA上密码子进行识别的部位,识别的过程就是碱基配对。连接于tRNA的氨基酸在识别过程中有何作用?此问题可用以下方法回答。首先,将半胱氨酸连接到其相应的tRNA上(以tRNA<sup>Cys</sup>表示)。将半胱氨酸-tRNA<sup>Cys</sup>与阮来镍反应,使活化半胱氨酸残基脱硫生成丙氨酸,但并不改变它与tRNA的连接。



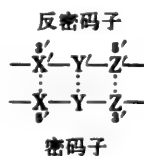


这样制成了一个杂交氨基酰-tRNA，即丙氨酸和特异于半胱氨酸的tRNA的共价结合物。此杂交tRNA是识别丙氨酸还是半胱氨酸的密码子呢？用此杂交tRNA在无细胞蛋白质合成体系中进行实验的结果提供了答案。体系中的模板是用以5：1混合的U和G的随机共聚体，它通常导致半胱氨酸（UGU）而非丙氨酸（GCX）的掺入。但在此混合保温液中加入丙氨酸-tRNA<sup>Cys</sup>时，发现丙氨酸掺入了多肽。换言之，丙氨酸因为是连接在特异于半胱氨酸的tRNA上就象是半胱氨酸似的掺入了。因此，密码子的识别并不决定于连接在tRNA上的氨基酸。

当用血红蛋白的mRNA作模板时也得到了同样的结果。所用杂交氨基酰-tRNA是<sup>14</sup>C-丙氨酸-tRNA<sup>Cys</sup>。实验中含有的唯一放射性胰酶解多肽（即含<sup>14</sup>C-丙氨酸的）是正常时含半胱氨酸而非含丙氨酸的多肽。另一方面，正常时应含丙氨酸而非含半胱氨酸的任何多肽都未发现放射性。此实验与前一实验无可置疑地证实了氨基酰-tRNA上的氨基酸在选择密码子中不起作用。

### 由于摆动使一种转移RNA分子可以识别几种密码子

控制着tRNA反密码子识别密码子的规律是什么？一个简单的假说是，密码子上的每一个碱基可与反密码子上互补的碱基形成一个沃森-克里克型的碱基对。这样，密码子和反密码子形成了反平行的排列。在附图上，符号“'”表示互补的碱基。这样，X和X'可代表A和U（也可是U和A）或代表G和C（也可是C和G）。按此模式预计一种特定的反密码子



只能识别一种密码子。事实却非如此，某些纯化的tRNA分子却能识别几种密码子。例如，霍利研究的酵母丙氨酸tRNA可结合三种密码子：GCU，GCC和GCA。这些密码子前二个碱基是相同的，第三个却不同。是否识别密码子的第三个碱基有时比前二个要求略低呢？遗传密码的简并变化表示有此可能。XYU和XYC总是编码同一个氨基酸，XYA和XYG亦常如此。克里克从这些资料推测，第三个碱基配对在空间尺度要求上严格性比其它二个低。于是制成了各种碱基对的模型，将核苷键间的距离和夹角与标准的A-U和G-C碱基对进行比较，看哪些与后者更相似。在此研究中也包括次黄苷，因为它出现在好几

表27-2 按摆动假说，密码子上第三个碱基的可行配对

反密码子第一个碱基	密码子第三个碱基
C	G
A	U
U	A或G
G	U或C
I	U, C, 或A

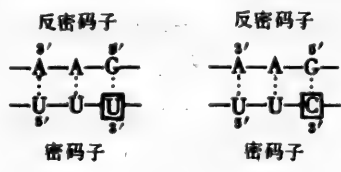


个反密码子上。假定密码子第三个碱基的配对中允许某些空间自由度(“摆动”),可能的组合有如表27-2所示。

摆动假说现已被完全肯定。已知顺序tRNA的反密码子可与按此假说预计的密码子结合。例如,酵母丙氨酸tRNA的反密码子是IGC。此tRNA可识别GCU, GCC和GCA密码子。



因此,正如预计, I可与U、C或A配对。反密码子为GAA的苯丙氨酸tRNA,可识别密码子UUU和UUC,而不识别UUA和UUG。



于是正如摆动假说预计的, G可与密码子第三位的U或C配对。

关于密码子-反密码子相互作用的二个通则是:

1. 密码子前二个碱基以标准形式配对。识别是精确的。因此,若密码子前二个碱基中只有一个不同,即会被不同的tRNA识别。例如, UUA和CUA二者都编码亮氨酸,但是被不同的tRNA识读。

2. 反密码子第一位的碱基决定了一种特定的tRNA分子能识读一种、二种还是三种密码子: C或A (一种密码子) U或G (二种密码子) 或 I (三种密码子)。因此,遗传密码的简并性部分是由于密码子第三位碱基配对的不严格(摆动)所致。此处我们看到了稀有核苷之一的次黄苷在反密码子中经常出现的主要原因。次黄苷使一种特定的tRNA分子识读的密码子达最高数目(图27-8)。

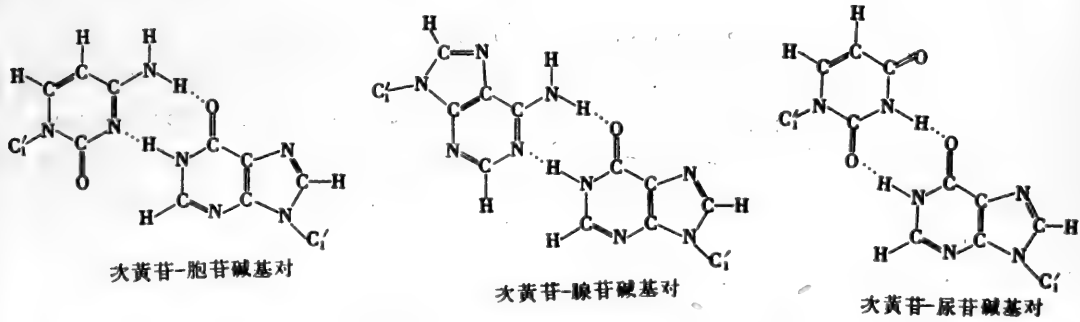


图27-8 次黄苷由于摆动可与胞嘧啶、腺嘌呤或尿嘧啶形成碱基对。

## 突变型转移RNA分子可抑制其它突变

对密码子识别过程的进一步了解来自突变tRNA的研究，其反密码子中有一个碱基发生了改变。实质上，自然界出现的这种自发突变和体外将氨基酸tRNA中的氨基酸加以化学修饰是相反的二个过程。这些突变型tRNA的发现很有趣。多年来遗传学家已知某些不利突变的效应能被第二次突变所逆转。假设一种酶由于GCU（丙氨酸）突变成GAU（天冬氨酸）而失活。有什么突变可恢复此酶的活性呢？

1. 同一碱基的逆转突变， $A \rightarrow C$ ，将产生原来的密码。
2. 另一种突变， $A \rightarrow U$ ，可提供缬氨酸（GUU），其结果是产生部分或全部有活性的酶。
3. 在同一基因的另一部位发生突变，此或可逆转第一个突变的效果。这种变化了的蛋白质和野生型相比有二个氨基酸不同。
4. 在另一基因上发生的突变也可能克服第一个突变的不利效应，这种突变称基因间抑止（intergenic suppressor）。

长久以来基因间抑止作用的方式是一个谜。通过遗传学和生物化学的研究，现在我们知道大多数这类抑止作用是改变mRNA的读码。例如，设想有一个突变导致终止信号UAG密码子的出现。其结果是产生一个不完全的多肽链。这种突变称无意义突变，因为不完全的多肽链一般没有活性。UAG无意义突变可由几个其它基因的突变所抑止。其中一种抑止是把UAG读码成酪氨酸的密码子，它引导合成一个有功能的蛋白质而不是一个不完全的多肽链（图27-9）。为什么这一突变的tRNA分子在UAG密码子的部位插入一个酪氨酸呢？酪氨

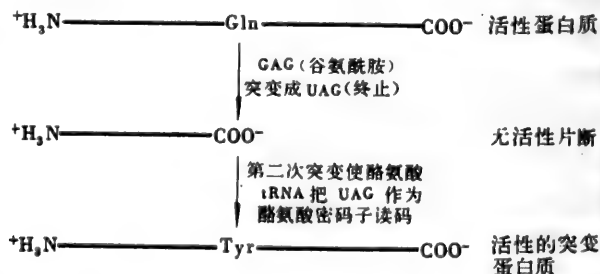
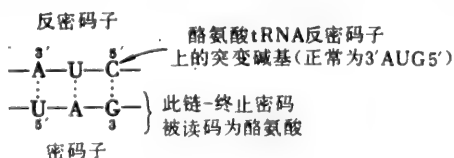


图27-9 tRNA分子上的第二次突变抑制了一个链终止的突变。

酸tRNA通常识别密码子UAC和UAU。此突变tRNA和正常酪氨酸tRNA之间只在反密码子的一个碱基上有所不同：GUA变成了CUA，其余都一样。而在反密码子上此第一个碱基G→C的突变，改变了它的识别性质，正如摆动假说预言的，此反密码子的变化使它仅能识别UAG。



假如发生突变的tRNA是一些非必要的tRNA时，这种抑止突变就更易被选用。换言之，必需有另一种tRNA和突变tRNA一样能识别同样的密码子。事实上大肠杆菌就有二种不同的tRNA，它们通常能识别UAC和UAU二者。存在量少的一种是发生变化的。这种量少的酪氨酸tRNA的正常功能尚未肯定。制止突变的存在引起了另一个问题。如果突变生成的UAG被读码成酪氨酸而不是终止信号，那末正常链的终止又如何呢？使人惊异的是，在抑止突变株中大多数多肽链能正常终止，可能终止信号不止UAG一个。事实上，一些信息的终止已知有二个不同的终止密码子。而且抑止作用也并不完全有效。

还鉴定了许多种其它突变tRNA。错义抑止 (missense suppressors) 使mRNA的读码改变，因而在某些密码子处的一个氨基酸被另一个代替 (例如甘氨酸替换了精氨酸)。移码抑止 (frameshift suppressors) 特别有趣。其中一种在其反密码子环上多了一个额外的碱基。因此一个密码子读码四个而不是三个核苷酸。特别是苯丙氨酸的密码子读码成UUUC而不是UUU。因插入一个额外碱基所致的突变能被这种改变了的tRNA所抑止。

核糖体是蛋白质合成的细胞器，

它由大亚基和小亚基组成

现在转而讨论蛋白质合成机制。此复杂过程发生在核糖体上，它可看作是蛋白质合成的细胞器，正如线粒体是氧化磷酸化的细胞器。核糖体有高度特化和复杂的结构，直径约200 Å。对大肠杆菌核糖体了解得最清楚。大肠杆菌核糖体质量为2,500 kdal，沉降系数是70S。它能解离成一个大亚基(50S)和一个小亚基(30S)。这些亚基尚可进一步分解成组成它们的蛋白质和RNA。30S亚基含有二十一种蛋白质和一个16S RNA分子。50S亚基含有约三十四种蛋白质和二个RNA分子，其中一个为23S，另一个是5S。大肠杆菌核糖体质量中三分之二是RNA，其余三分之一是蛋白质。

真核细胞胞浆中的核糖体略大于细菌中的。一个完整的真核细胞核糖体的沉降系数是80S。类似细菌的核糖体，它也可解离成一个大亚基(60S)和一个小亚基(40S)。小亚基中含有一个单一的18S RNA分子，而大亚基中含有三个RNA分子(28S, 7S和5S)。线粒体和叶绿

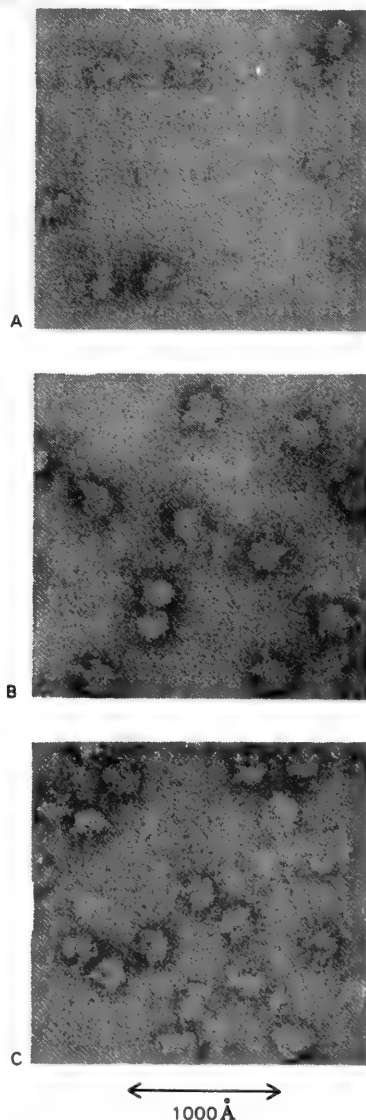


图27-10 (A)30S亚基，(B)50S亚基和(C)70S核糖体的电镜图。[蒙Dr. James Lake特许。]

体中的核糖体和真核细胞胞浆中的核糖体不同。它们更象70S而不是80S的颗粒。事实上，在线粒体、叶绿体和细菌中的蛋白质合成间有许多相同点。

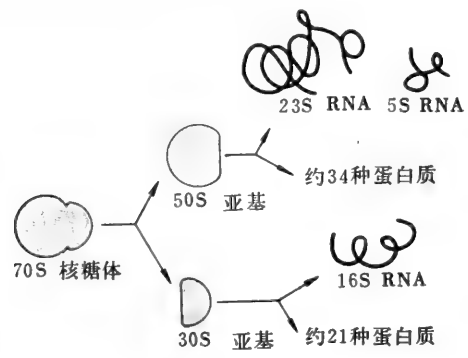


图27-11 核糖体能解离成约五十五种蛋白质和三个RNA分子。

核糖体能由其组成的蛋白质和RNA分子得到重建

30S核糖体亚基能由16S RNA及其组成的二十一种蛋白质的混合物中得到重建。1968年，野村，M. (Masayasu Nomura) 首先完成使这些组成成分自发重装配成一个具有完整功能的30S亚基。几年后，50S亚基也获得了重建。这些实验的重要性是双重的。第一，它证实使此细胞器正确重装配的全部信息皆含在其组成成分的结构中。并不需要非核糖体因子。因此，体外核糖体的形成是一个自动装配的过程。其次，可利用重建实验以确定对于核糖体的装配哪一种成分或某一种特殊功能是必需的。例如，与抗菌素链霉素敏感性有关的组分就是用此法鉴定出来的 (517页)。从重建30S亚基的研究中得出了以下的结论：

- 1. 16S RNA是其装配和功能的必需部分。对它的



图27-12 聚丙烯酰胺凝胶双向电泳分离50S核糖体亚基上的蛋白质。  
[蒙Dr. Charles Cantor特许。]

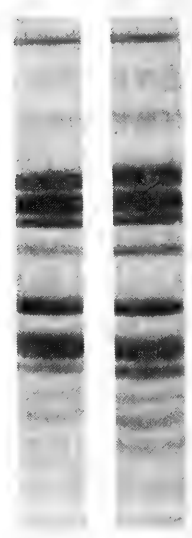


图27-13 (左)天然30S核糖体亚基和(右)重建30S亚基的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。所有天然亚基中存在的蛋白质也出现在重建亚基中。[蒙Dr. Masayasu Nomura 特许。]

需要十分特异。因为酵母的16S RNA不能代替大肠杆菌的16S RNA。核糖体RNA分子的作用是一个具有挑战性的研究领域。

2. 在重建实验中，曾试行五次减少一种蛋白质从而观察是否由其余二十种蛋白质加16S RNA可装配出完整的30S颗粒。发现至少六种蛋白质对装配成30S颗粒是必需的。

3. 重装配成具有活性功能的30S颗粒（除需16S RNA外），二十一种蛋白质中的大多数是必需的。因此，30S亚基是一个具有协同功能的实体。

## 蛋白质合成的方向是从氨基到羧基

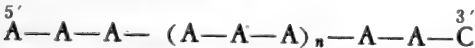
关于蛋白质合成机制，首先提出的问题之一是蛋白质合成的方向是从氨基到羧基还是相反的方向。丁泽斯，H. (Howard Dintzis) 的脉冲-标记研究提供了一个明确的回答。将能活跃进行血红蛋白合成的网织红细胞与<sup>3</sup>H-亮氨酸保温，并将时间控制在短于合成一条完整链所需的时间内。将释放出来的血红蛋白解离成α和β链并用胰蛋白酶处理。再测定这些肽的比放射性——即其放射量除以其亮氨酸总量。放射性在近羧基端的肽高于近氨基端的肽。事实是，每条链从氨基端到羧基端放射性存在着梯度的增加（图27-14）。羧基端标记多是因为它合成在后。因此，链成长的方向是从氨基端到羧基端。



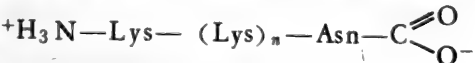
图27-14 以氘亮氨酸短期标记网织红细胞后，合成的血红蛋白α链上<sup>3</sup>H-亮氨酸的分布。羧基端放射性比氨基端高表明羧基端合成在后。

## 信使RNA翻译的方向是5'→3'

用人工合成的多核苷酸

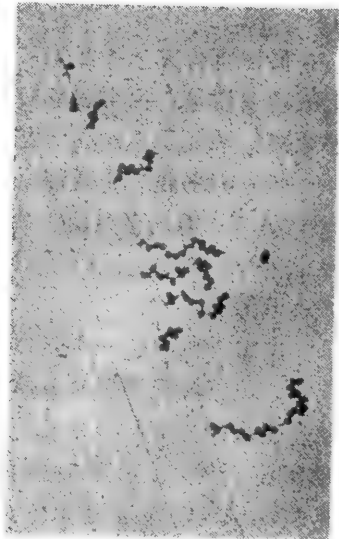


作模板，在无细胞蛋白质合成体系中测定mRNA的读码方向。AAA编码赖氨酸，而AAC编码天冬酰胺。此多肽产物是



由于天冬酰胺是羧基端的残基，密码子AAC就是被最后读码的。因此，翻译的方向是5'→3'。记得mRNA合成的方向也是5'→3'（474页）。这意味着mRNA在合成时即可翻译。事实上，在大肠杆菌，mRNA的5'端合成后不久就和核糖体作用（图27-15）。因此，翻译是和转录紧密地联系在一起的。

图27-15 大肠杆菌一个节段DNA的转录和新生mRNA的翻译。染色体只有一部分在进行转录。[引自O. L. Miller, Jr., Barbara A. Hamkalo, and C. A. Thomas, Jr., Visualization of bacterial genes in action. Science 169 (1970): 392.]



## 数个核糖体同时翻译一个信使RNA分子

多个核糖体可同时翻译一个mRNA分子。这显著地增高了mRNA的利用率。结合在一个mRNA分子上的一群核糖体称多核糖体。在这单元中的核糖体各自独立地发挥作用,每个合成一条完整的多肽链。在mRNA上核糖体的最大密集度是每八十个核苷酸有一个核糖体。合成血红蛋白(它每条链含有约145个氨基酸,或每个mRNA含有500个核苷酸)的多核糖体典型地含有五个核糖体。最接近mRNA 5'端的核糖体有最短的多肽链,而接近3'端的含几乎是完成的链。当多肽产物被释放出来后,核糖体即解离成30S和50S亚基。

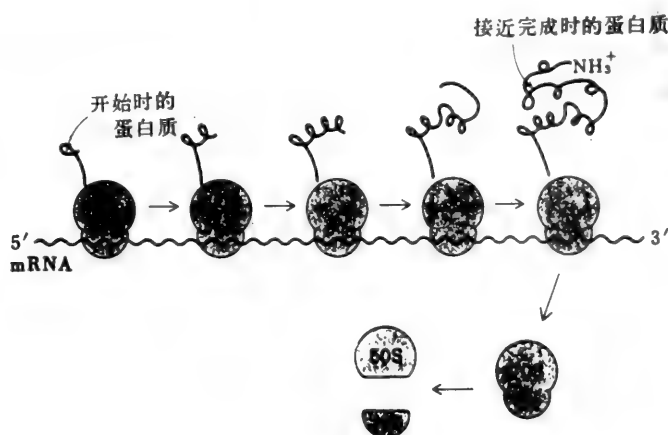


图27-16 多核糖体的图示。核糖体沿mRNA以5'→3'方向移动。其功能是彼此独立的。

## 细菌蛋白质的合成由甲酰甲硫氨酸转移RNA起始

蛋白质合成怎样开始? 首先最简单的可能性是整个mRNA都得到翻译, 这样就不需要特定的起始信号。但实验事实是, 翻译并不就从mRNA的5'端开始。事实上翻译的第一个密码子距离5'端几乎总是大于25个核苷酸。并且, 在原核细胞中许多mRNA分子是多顺反子的——即它们编码二个或多个多肽链。例如, 在大肠杆菌, 一个单一约含7,000个核苷酸的mRNA分子编码色氨酸生物合成途径中的五种酶。在此mRNA上每个酶有其自己的起始和终止信号。事实上, 所有已知细菌的mRNA分子对其编码的各个多肽链都有决定其起始和终止的信号。

大肠杆菌中近一半蛋白质的氨基端都是甲硫氨酸, 这个发现为链合成的起始机制提供了线索, 但甲硫氨酸在多肽链的其它部位却并不普遍。而且新合成的蛋白质的氨基端常经修饰, 这表明起始时有一个甲硫氨酸的衍生物参与作用。事实是, 细菌中蛋白质合成起始于甲酰甲硫氨酸 (fMet)。存在一种特定的tRNA能将甲酰甲硫氨酸带到核糖体上, 使蛋白质合成起始。此起始tRNA(缩写为tRNA<sub>f</sub>)与使甲硫氨酸进入多肽链内部位置的tRNA(缩写为tRNA<sub>m</sub>)不同。写在下角的符号f表示连接在起始tRNA上的甲硫氨酸可被甲酰化。而接在tRNA<sub>m</sub>上

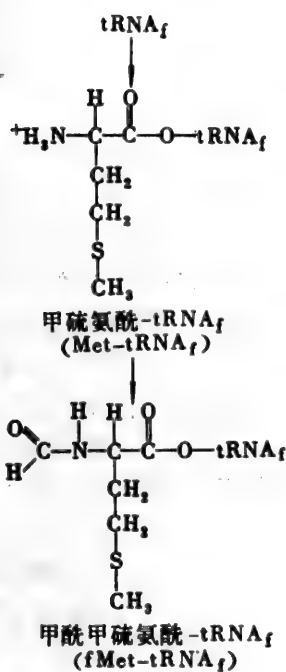


图27-17 甲酰甲硫氨酸-tRNA<sub>f</sub>的生成。

的却不能被甲酰化。

甲硫氨酸连接到这二种tRNA上是由同一种氨基酰-tRNA合成酶催化的。然后, 由一个特异的酶将连接在tRNA<sub>f</sub>上的甲硫氨酸的氨基甲酰化。此反应中活性甲基的供体是N<sup>10</sup>-甲酰四氢叶酸。值得注意的是游离甲硫氨酸和甲硫氨酰-tRNA<sub>m</sub>不是此转甲酰酶的底物。

起始信号是AUG (或GUG), 在其前

有数个能与16S RNA配对的碱基

区别两种AUG密码子的结构基础是什么? 回答此问题的第一步是从数种mRNA中分离出起始区。这要先用胰核糖核酸酶消化mRNA-核糖体复合物(复合物是在链起始而非链延长的条件下形成的)。每一例皆有约含三十个核苷酸的序列由于受保护而不被消化。正如预期, 每个起始区皆含有一个AUG (或GUG) 密码子(图27-18)。另外, 每一起始区在距起始密码子5'端约十个核苷酸处集中一段富含嘌呤的序列。当16S RNA的顺序

阐明后, 此富含嘌呤区段的作用就明确了。此核糖体RNA的3'端有一段含数个碱基的序列,

AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC	大肠杆菌trpA
UUUGGAUGGAGUGAAACGAUGGCGAUUGCA	大肠杆菌araB
GGUAACGAGGUAACAACCAUGCGAGUGUUG	大肠杆菌thrA
CAAUUCAGGGUGUGAAUGGAAACCAGUA	大肠杆菌lacI
AAUCUUGGAGGCUUUUUUAUGGUUCGUUCU	φx174噬菌体A蛋白
UAACUAAGGAUGAAUGCAUGUCUAAGACA	Qβ噬菌体复制酶
UCCUAGGAGGUUGACCUAUGCGAGCUUUU	R17噬菌体A蛋白
AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC	λ噬菌体cro

16SrRNA配对 与起始tRNA 配对

图27-18 一些细菌和病毒RNA分子的蛋白质合成起始部位的序列。

与mRNA起始部位富含嘌呤的区段互补。事实上, 从起始复合物的酶消化液中已分离得到16S RNA 3'端和mRNA起始区结合的复合物(图27-19)。七十多种已知起始部位的序列表

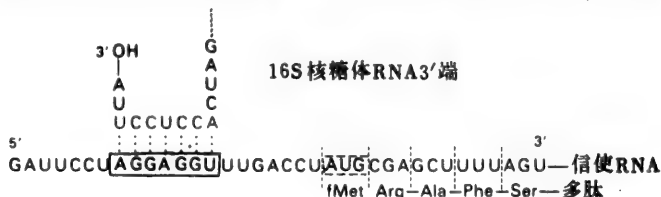


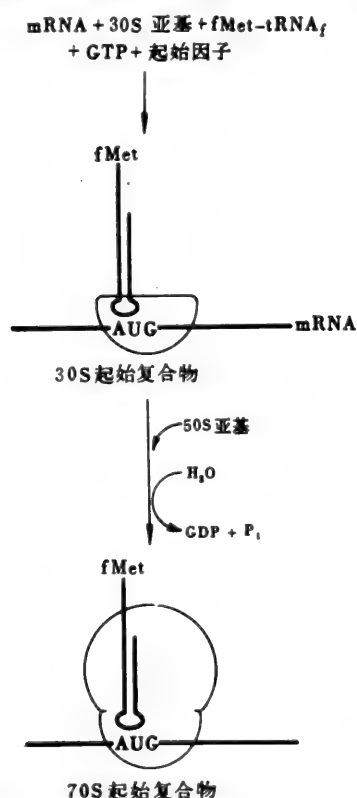
图27-19 mRNA起始区的富含嘌呤区段(实线框)和16S rRNA 3'端的碱基配对。AUG密码子(虚线框)决定多肽链的起始。此处所示mRNA编码R17噬菌体的A蛋白。



明在mRNA和16S rRNA间的碱基配对数约为三到九个。一个有趣的可能性是起始效率受到这一相互作用力的调节。因此，决定蛋白质合成的有二种相互作用：即mRNA与16S rRNA 3'端的碱基配对和mRNA与甲酰甲硫氨酸起始tRNA的配对。

70S 起始复合物的形成使甲酰甲硫氨酸tRNA进入P位

蛋白质的合成起始于mRNA、30S核糖体亚基和甲酰甲硫氨酸-tRNA<sub>f</sub>的结合，形成一个30S起始复合物（图27-20）。生成此复合物还需要GTP和三种蛋白质因子即起始因子1或



·图27-20 蛋白质合成的起始阶段：生成一个30S起始复合物，继而生成一个70S起始复合物。

IF-1，起始因子2或IF-2和起始因子3或IF-3。其中起始因子IF-3，参与mRNA结合到30S亚基复合物上。起始因子IF-3也阻止50S和30S亚基缩合成排外mRNA的终末70S复合物。起始因子IF-1和起始因子IF-2促进起始tRNA结合到mRNA-30S亚基复合物上。

然后一个50S核糖体亚基与一个30S起始复合物连接生成一个70S起始复合物。在此步中结合着的GTP被水解。70S起始复合物（图27-20）即可进行蛋白质合成的延长阶段了。fMet-tRNA<sub>f</sub>分子占据了核糖体的P位（肽酰位）。核糖体的另一个tRNA分子的位点即A位（氨基酰位）还空着。通过嘌呤霉素的研究推断出有不同的P位和A位的存在，此抗菌素后面将要讨论518页。现在重要的一点是fMet-tRNA<sub>f</sub>定位于一点，以便其反密码子和mRNA上的起始密码子AUG（或GUG）配对。因此，读码框架就由核糖体与fMet-tRNA<sub>f</sub>和mRNA的特异相互作用确定了。尤其回顾前述在起始密码子5'-侧的富含嘌呤的区段可与30S亚基的一个组分——16S rRNA的3'端碱基配对。了解了起始tRNA正确占位的错综复杂过程后又引出了一个有趣的问题。在试图阐明遗传密码的研究中，使用的无起始信号的人工合成多聚尿苷酸和其它多核苷酸，是怎样被翻译的呢（486页）？回答是在反应体系中因为Mg<sup>2+</sup>浓度比体内高，故幸运地发生了非特异的起始。

延长因子Tu把氨基酰-tRNA提到核糖体的A位上

蛋白质合成的延长循环包括三步：（1）氨基酰-tRNA的结合（密码子的识别），（2）肽键的形成和（3）移位。循环起始于一个氨基酰-tRNA进入核糖体空着的A位。进入的是哪一种氨基酸取决于在A位上的mRNA密码子。称为EF-Tu的蛋白质延长因子将互补的氨

原文误为多肽——译者注。



基酰-tRNA 安置到A位。当氨基酸-tRNA 在核糖体上正确占位后,结合在EF-Tu上的GTP即水解。在被另一个延长因子EF-Ts置换之前,GDP一直与EF-Tu紧密结合在一起。如此形成的Tu和Ts复合物随后由于GTP的进入生成Tu-GTP复合物而分解开,Tu-GTP就又准备好进行第二轮的蛋白质合成。GTP的水解促进了这个结合和释放蛋白质的循环(图27-21)并指定了它的进行方向。

必需注意EF-Tu不与fMet-tRNA<sub>f</sub>起反应。因此,起始tRNA不能被送到A位。相反,Met-tRNA<sub>m</sub>和其它所有氨基酸-tRNA一样,都可与EF-Tu结合。此发现解释了为何链中间的AUG密码子不能被起始tRNA识读。

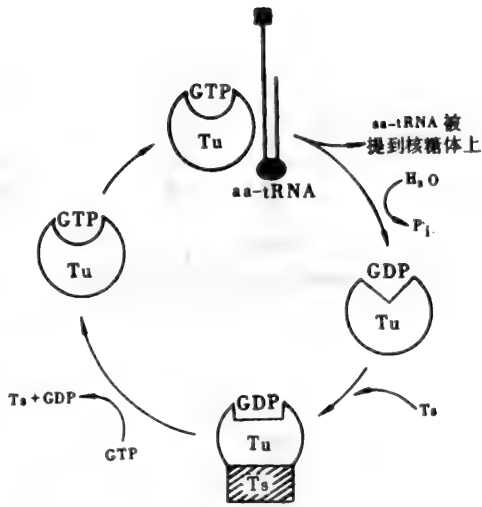


图27-21 延长因子Tu的反应循环。

### 肽键生成后随即发生移位

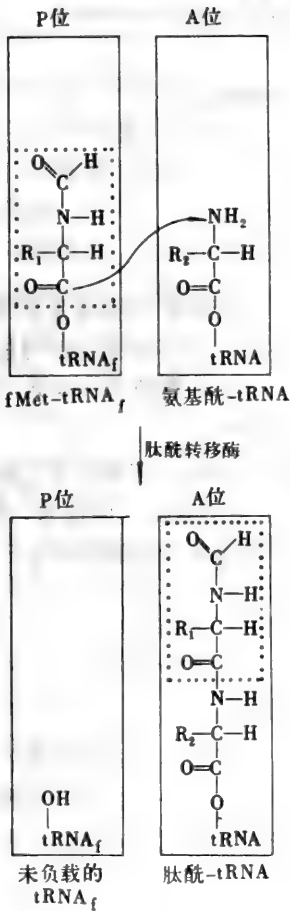


图27-22 肽键的生成。

现在复合物中有一个氨基酸-tRNA 占居A位和fMet-tRNA 占居P位。肽键形成的条件已成熟(图27-22)。此反应由肽酰转移酶催化,此酶是50S亚基的一个不可缺少的构成成分。在P位上的fMet-tRNA<sub>f</sub>的活化的甲酰甲硫氨酸单元被转到在A位的氨基酸-tRNA的氨基上,生成了一个二肽酰-tRNA。

形成一个肽键后,一个无负载的tRNA占居在P位,而一个二肽酰-tRNA占居在A位。延长循环的下一步是移位。有三个动作发生了:无负载的tRNA从P位脱落,肽酰-tRNA从A位转移到P位和mRNA移动三个核苷酸的距离。结果是下一个密码子被放在进入的氨基酸-tRNA可识读的地位。移位需要第三个延长因子,即EF-G(亦称移位酶)。结合在EF-G上的GTP在移位时水解。GTP的水解使EF-G得以从核糖体上释放出来,从而发挥催化活力。此处我们又看到核苷三磷酸水解为定向移动提供动力的另一例子。移位后,A位空出,又准备好再结合一个氨基酸-tRNA开始另一周期的延长过程(图27-23)。

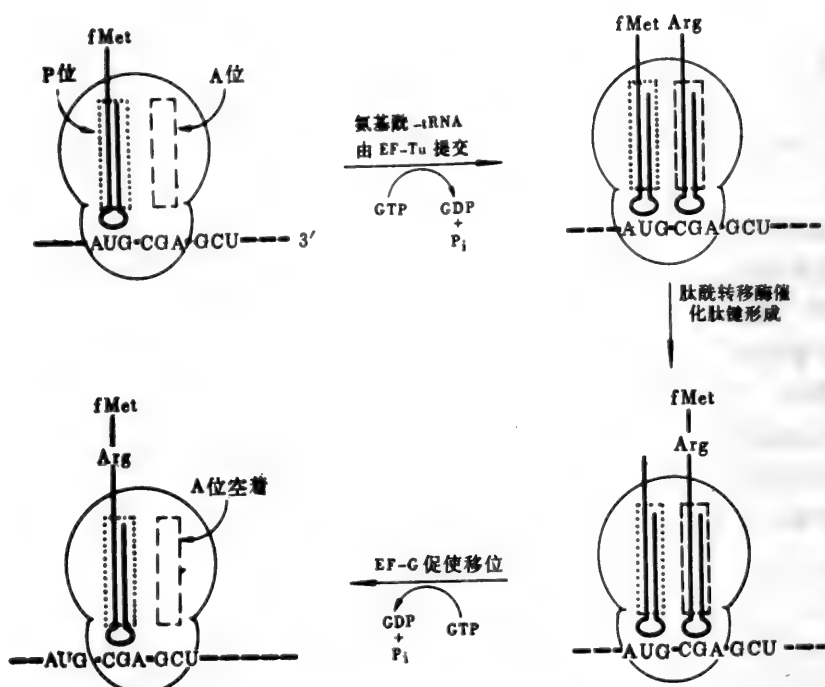


图27-23 蛋白质合成的延长阶段：氨基酸-tRNA的结合，肽键的生成和移位。

## 释放因子使蛋白质合成终止

假如A位上密码子是UAA, UGA或UAG时, 氨基酸-tRNA通常不能结合到核糖体上。正常细胞不含具有能和这些终止信号互补的反密码子的tRNA。但这些终止信号能被释放因子识别, 后者是蛋白质。释放因子RF-1识别UAA或UAG。另一释放因子RF-2识别UGA或UAA。因此, 蛋白质在识别三核苷酸序列上有高度特异性。

A位上的终止密码子和释放因子的结合以某种方式活化了肽酰转移酶, 它使P位上的多肽与tRNA之间的连接键水解。释放因子使肽酰转移酶的特异性发生了变化, 因此水, 代替了氨基, 成为活化肽酰基的受体。此时多肽链脱离了核糖体。70S核糖体于是解离成30S和50S亚基, 作为合成另一个蛋白质分子的序曲。

## 许多蛋白质在翻译后再经修饰

许多在翻译mRNA后生成的肽并不是终产物。蛋白质随后可经过多种形式的修饰:

1. 细菌蛋白质氨基末端的甲酰基被脱甲酰基酶水解。氨基末端的一个或几个氨基酸残基可被氨基肽酶切除。无论在原核或真核生物中, 在余下的多肽链继续合成时末端甲硫氨酸有时被水解。
2. 二个半胱氨酸残基被氧化生成二硫键。

3. 某些氨基酸侧链将被特异修饰。例如，胶原中一些脯氨酸和赖氨酸残基被羟化。天冬酰胺，丝氨酸和苏氨酸侧链接上糖生成糖蛋白。有些蛋白质被磷酸化。有些酶被共价连接于辅基，如硫辛酸上。

4. 多肽链可能被特异地切断，如前胶原转变成胶原和胰岛素原转变成胰岛素。脊髓灰质炎病毒的mRNA被翻译形成一条很长的多肽链，后者再水解生成几个蛋白质。

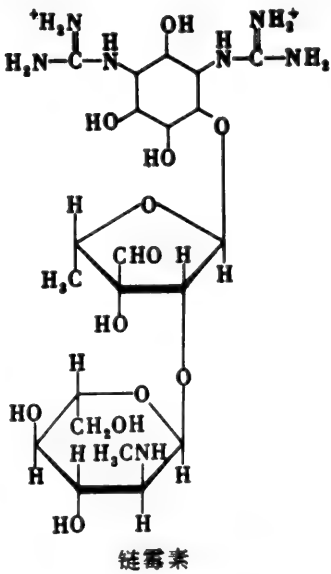
### 链霉素抑制起始过程和造成错读信使RNA

我们已知抗菌素在生物化学中是非常有用的工具，因为它们中不少有高度的作用特异性。例如，利福平是RNA合成起始时的强抑制剂（478页）。已知不少抗菌素是蛋白质合成的抑

表 27-3 蛋白质合成的抗菌素抑制剂

抗菌素	作用
链霉素	抑制起始和造成读码mRNA的错误（原核生物）
四环素	和30S亚基结合，抑制氨基酰-tRNA的结合（原核生物）
氯霉素	抑制核糖体50S亚基的肽酰转移酶活力（原核生物）
放线菌酮	抑制核糖体60S亚基的肽酰转移酶活力（真核生物）
红霉素	和50S亚基结合并抑制移位（原核生物）
嘌呤霉素	作为氨基酰-tRNA的类似物，造成链的过早终止（原核和真核生物）

制剂，其中有些的作用机制也已确知。链霉素是一种强碱性的三糖，它干扰甲酰甲硫氨酰tRNA和核糖体的结合，从而抑制蛋白质合成的正确起始。链霉素也导致mRNA读码的错误。若以多聚尿苷酸作模板，则除苯丙氨酸(UUU)外，异亮氨酸(AUU)也掺入了。已用重组实验确定了链霉素在核糖体上的作用部位，即将对链霉素敏感和抗链霉素的细菌中获得的核糖体组分配合起来。这些菌株相互之间有一个单一基因突变的差异。它们的核糖体有什么不同呢？由于核糖体可在体外被解离和装配，因此有可能去测定对链霉素敏感的决定簇是处在核糖体的50S还是30S亚基上。从抗药菌得到50S亚基和从敏感菌得到30S亚基，这两者杂交形成的核糖体对链霉素敏感，而另一组相反的组合制成的核糖体却抗药。此实验表明，对链霉素敏感的决定簇定位在30S亚基上。接下来的实验发现，是30S亚基上的一种蛋白质而不是16S RNA分子决定着对链霉素的敏感性。最后，一系列广泛的实验揭示，是30S亚基上的一种单一的蛋白质，称S12蛋白质，是链霉素敏感性的决定簇。



### 嘌呤霉素模拟氨基酰-转移RNA导致链合成的过早终止

抗菌素嘌呤霉素抑制蛋白质合成是使新生的多肽链在合成未完成之前就释放出来。嘌呤

霉素是氨基酰-tRNA末端的氨基酰-腺苷部分的类似物(图27-24)。它和核糖体A位结合,抑制了氨基酰-tRNA的进入。另外,嘌呤霉素含有一个 $\alpha$ 氨基。此氨基与氨基酰-tRNA上的氨基相似,通过肽酰转移酶的催化与生长着的肽链的羧基生成肽键,产物是羧基端有一个以共价键相连的嘌呤霉素残基的多肽。肽酰嘌呤霉素然后从核糖体上释放出来。曾用嘌呤霉素来确定核糖体的功能状态。事实上,A位和P位的概念就是从应用嘌呤霉素确定了肽酰-tRNA部位的实验中得出来的结论。当肽酰-tRNA在A位时(移位前),它不能和嘌呤霉素起反应。

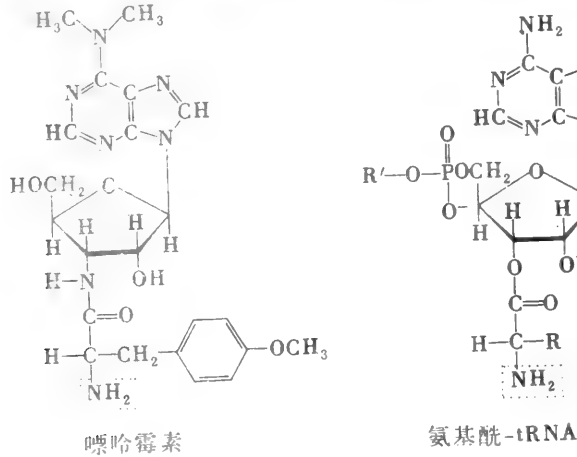


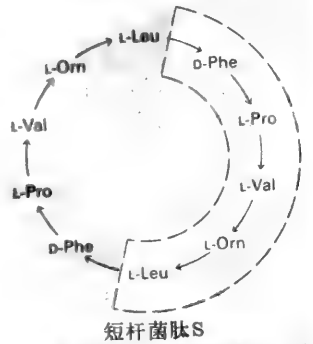
图27-24 嘌呤霉素与氨基酰-tRNA的氨基末端相象。

### 有些短肽不是由核糖体合成的

我们现在转向生物系统中另一个不同的肽键形成机制。作为一例,让我们考虑一种由二个相同的五肽头尾相连生成的环多肽——短杆菌肽S的生物合成。此抗菌素是由某种短芽胞杆菌菌株,一种产生孢子的细菌合成的。

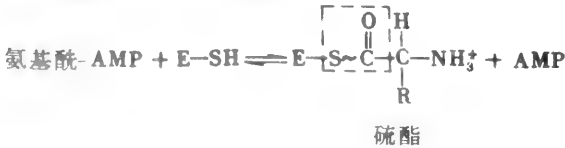
短杆菌肽S的合成不依靠核糖体或mRNA。它只需要一个简单得多的,只含有二个酶,  $E_I$  和  $E_{II}$  的合成机构。D-苯丙氨酸由  $E_I$  (100kda) 活化,而五肽单位中的其它四个氨基酸是由  $E_{II}$  (180kda) 活化。此二种酶也都参与肽键的生成。

在此系统中,氨基酸活化是生成与酶结合的硫酯。活化氨基酸是连接在  $E_I$  或  $E_{II}$  的巯基上而不是tRNA的3'端的羟基上。



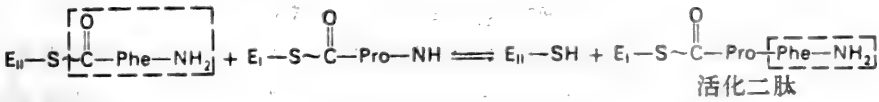
短杆菌肽S

图27-25 短杆菌肽S的氨基酸顺序,一种环多肽由二个相同的五肽单位组成。箭头表示肽链的极性(从氨基到羧基方向)。

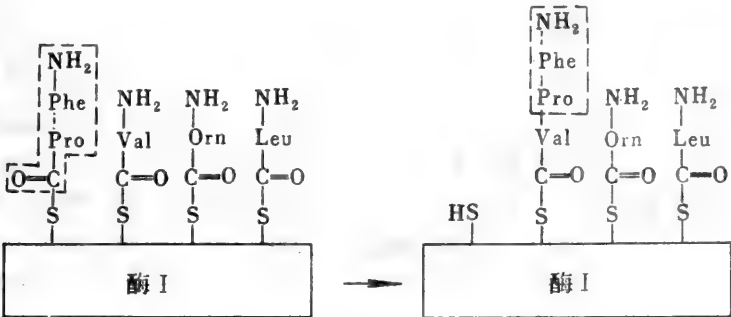


L-脯氨酸, L-缬氨酸, L-鸟氨酸和L-亮氨酸在和ATP一起保温时与E<sub>I</sub>上特异的巯基连接生成硫酯。同样, 当有ATP时D-苯丙氨酸与E<sub>II</sub>生成硫酯键。

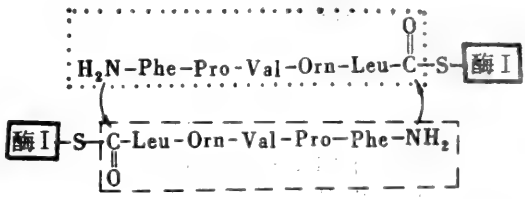
在此系统中, 肽的合成起始于E<sub>I</sub>和E<sub>II</sub>的相互作用。E<sub>II</sub>上的D-苯丙氨酸残基被转移到E<sub>I</sub>上的L-脯氨酸残基的亚氨基上, 生成一个二肽。随后的反应只需要E<sub>I</sub>参加。二肽中脯氨酸残基上活化的羰基与同一酶上缬氨酸残基上的氨基反应, 生成一个三肽。此过程再在鸟



氨酸、亮氨酸残基上相继发生, 即生成一个与酶结合的五肽。此增长着的肽每当一个肽键生成后就被移至另一个巯基上。



最后, 接在二个不同的E<sub>I</sub>分子上的活化五肽再彼此作用, 生成环状的短杆菌肽S。



这种生物合成途径有两个值得注意的特征:

1. 短杆菌肽S的氨基酸顺序是由酶E<sub>I</sub>和E<sub>II</sub>的空间安排和作用特异性决定的。每一个肽键的生成至少需要一个蛋白质亚基。所以, 和核糖体机制相比, 这种方式是不经济的。因此大于十五个残基的多肽的合成就不用这种机制了。
2. 短杆菌肽S的合成类似脂肪酸的合成。因为此二过程活化的中间物都是硫酯。而且, E<sub>I</sub>还含有一个共价连接的磷酸泛酰巯基乙胺残基。此硫醇可能把生长着的肽链从E<sub>I</sub>中的某一位置转移到下一个位置。李普曼, F. (Fritz Lipmann) 提出, 多肽抗菌素的合成可能是进化中早期蛋白质合成原始方式的幸存遗迹。而蛋白质在核糖体上的合成可能是从脂肪酸合成方式中进化来的。

## 概 要

蛋白质合成(翻译)要求一百多种大分子的相互协调作用,除核糖体外包括mRNA,许多tRNA,多种活化酶和各种蛋白质因子。蛋白质合成起始于氨基酸的ATP驱动活化,这是由氨酰-tRNA合成酶(活化酶)催化的,它把氨基酸的羧基连接到tRNA的3'末端腺苷单位的2'-或3'-羟基上。每种氨基酸至少有一种特异的活化酶。同样,每种氨基酸至少有一种特异的tRNA。具有不同特异性的各种转移RNA有一个共同的结构设计。它们是单一的RNA链,约有八十个核苷酸,并含一些被修饰(如甲基化)的标准碱基衍生物。所有已知tRNA的碱基顺序都可画成三叶草形结构,其中一半核苷酸是碱基配对的。x射线结晶图研究已明确,tRNA是L形的。3'CCA末端的氨基酸连接点位于L的一端,而反密码子是在相距约80Å的另一端。信使RNA识别的是tRNA的反密码子而不是连接着的氨基酸。mRNA上的密码子和tRNA上的反密码子碱基配对。有些tRNA可识别几种密码子,因为密码子的第三位碱基比其余二个碱基的配对分辨力差(摆动假说)。蛋白质合成在核糖体上进行,核糖体含有大亚基和小亚基,按重量计每种亚基皆含约三分之二RNA和三分之一蛋白质。在大肠杆菌中,70S核糖体(2,500kda)是由30S和50S亚基组成的。

蛋白质合成有三个阶段:起始,延长和终止。信使RNA甲酰甲硫氨酸-tRNA<sub>f</sub>和一个30S核糖体亚基结合生成一个30S起始复合物。在mRNA上的起始信号是AUG(或GUG),

在其前有一段富含嘌呤的顺序,它能与16S rRNA的碱基配对。然后一个50S核糖体亚基与此复合物结合,生成一个70S起始复合物。它为下一阶段作好了准备。延长循环包括氨酰-tRNA的结合(密码子识别),肽键生成和移位。链生长的方向是从氨基端到羧基端。蛋白质合成由释放因子终止,后者识别终止密码子UAA,UGA和UAG,并使多肽和tRNA之间的键水解。在形成70S起始复合物时,在氨酰-tRNA和核糖体结合时,和在移位阶段时皆有GTP水解。蛋白质合成的不同步骤可特异地被毒素和抗菌素抑制。多肽抗菌素和其它短肽是由类似脂肪酸合成的非核糖体途径合成的。

## 习 题

1. Ile-tRNA的生成经过一个与酶结合的Ile-AMP中间物。当下列各组化合物与特异活化酶一起保温后,试预测<sup>32</sup>P标记的ATP能否从<sup>32</sup>PP<sub>i</sub>转变生成。  
(a) ATP和<sup>32</sup>PP<sub>i</sub>  
(b) tRNA, ATP和<sup>32</sup>PP<sub>i</sub>  
(c) 异亮氨酸, ATP和<sup>32</sup>PP<sub>i</sub>
2. 从生长在“重”介质(<sup>13</sup>C和<sup>15</sup>N)和轻介质(<sup>12</sup>C和<sup>14</sup>N)的细菌中分离出核糖体。将这些70S核糖体加到能活跃进行蛋白质合成的体外系统中去。数小时后取出一份用密度梯度离心并分析。试预测70S核糖体在密度梯度上可显几条区带?
3. 从氨基酸开始合成一个含200个残基的蛋白质要消耗多少高能磷酸键?
4. 生物分子的延长有两种基本机制(图27-26)。第一种机制中,活化基团(以X表示)是从生长链上释放出来的。在第二种机制中,活化基团是从加到生长链上去的掺入单位上释放出来的。指出下列各生物合成属哪一种机制?

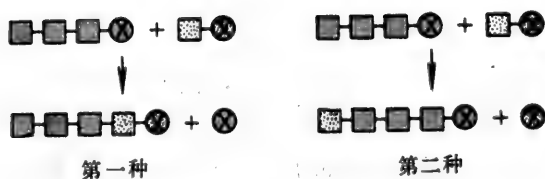


图27-26 延长的两种模式。

(a) 糖原合成

(b) 脂肪酸合成

(c) 胆固醇合成中  $C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15}$

(d) DNA合成

(e) RNA合成

(f) 蛋白质合成

5. 产生终止密码子的突变称无意义突变。这种突变可因tRNA的改变而抑止。例如，UGA密码子可被一突变tRNA翻译成色氨酸。在此突变tRNA中最可能的碱基改变是什么？
6. 设计一种可对大肠杆菌核糖体上的一种tRNA结合部位进行亲和-标记的试剂。你如何合成这种试剂？
7. 一个T7噬菌体基团的mRNA转录本具有以下的碱基顺序

5'-AACUGCACGAGGUAACACAAGAUGGCU-3'

预测箭头所示处的G转变成A的突变会产生什么结果。

8. 在蛋白质合成和DNA合成中校正方式的一个共同特点是什么？

其它习题可参阅W.B.Wood, J.H.Wilson, R.M.Benbow, and L.E.Hood, *Biochemistry: A Problems Approach* (Benjamin, 1974), ch.18.

## 第28章 基因表达的调控

如前所述,许多蛋白质的活性是通过诸如蛋白质水解活化,变构相互作用以及共价修饰等机制而被调节的。本章将论述蛋白质合成速度的控制,因为这对决定细胞中进行的反应类型至为重要。在细菌中,基因活动的调节主要在转录水平,而非在翻译水平中进行。我们将着重讨论大肠杆菌的乳糖及色氨酸操纵子和 $\lambda$ 噬菌体的调控,因为对这些系统调控的分子基础了解较多。对它们的深入研究亦提供了原核细胞及病毒中基因调控的一般性规律。真核细胞的基因调控则与此不同,将在下章探讨。

### $\beta$ -半乳糖苷酶是一诱导酶

大肠杆菌可用乳糖为其唯一碳源。在乳糖代谢中的一个必要酶是 $\beta$ -半乳糖苷酶,它使乳糖水解为半乳糖及葡萄糖(图28-1)。一个在乳糖中生长的大肠杆菌细胞含几千个 $\beta$ -半乳糖苷酶分子。但如果此菌生长在其它碳源,如葡萄糖或甘油中,则只含不到十个分子的 $\beta$ -半乳糖苷酶。乳糖能够诱导大肠杆菌通过合成新 $\beta$ -半乳糖苷酶分子过程而不是通过活化酶原来产生大量的(图28-2)。因此, $\beta$ -半乳糖苷酶是一诱导酶。与 $\beta$ -半乳糖苷酶协调一致合成的还有二种蛋白质,即半乳糖透酶和硫代半乳糖苷转乙酰基酶。将乳糖输送透过细菌胞膜需要透酶,但转乙酰基酶却对乳糖代谢并无重要作用;后者的生理作用尚不清楚。在体外,它催化乙酰CoA中的乙酰基转移到硫代半乳糖苷的C-6羟基上。

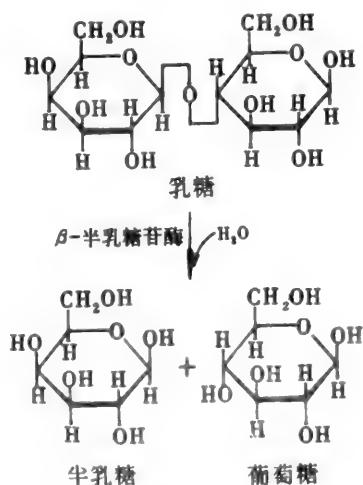


图28-1 乳糖被 $\beta$ -半乳糖苷酶水解。

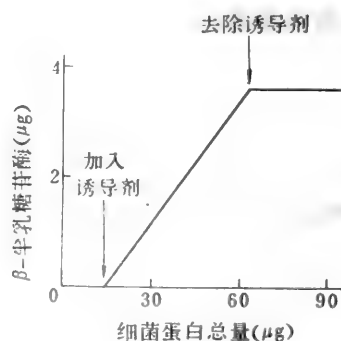
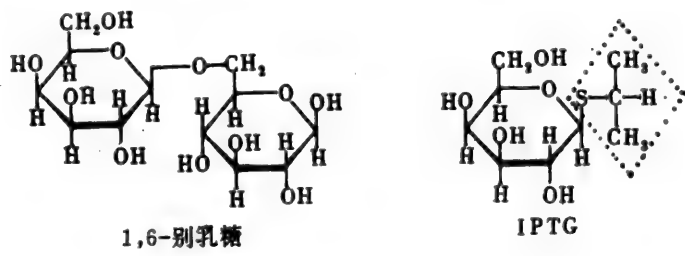


图28-2 在大肠杆菌培养中细胞数增长与 $\beta$ -半乳糖苷酶数量的增长成平行关系。图线的斜率表明合成的蛋白质中6.6%是 $\beta$ -半乳糖苷酶。

生理诱导物是由乳糖经糖基转移过程而生成的别乳糖。别乳糖的合成由诱导前就存在的少数几个 $\beta$ -半乳糖苷酶所催化。对诱导剂本质的研究指出,有些 $\beta$ -半乳糖苷是诱导剂而非 $\beta$ -半乳糖苷酶的底物,而另外的化合物则是底物而非诱导剂。例如,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)



是一个不被代谢的诱导剂（亦称安慰诱导剂）。



调节基因 的发现

无论以何种诱导剂做试验都发现，透酶和转乙酰基酶量的增高和 $\beta$ -半乳糖苷酶的增加直接相关：这一发现为诱导过程的本质提供了重要的线索。用变种研究更清楚地得知 $\beta$  半乳糖苷酶，透酶及转乙酰基酶分别由三个相连的，依次称为 $z$ ， $y$ 和 $a$ 的基因编码。已分离得到缺少这三种蛋白之一的变种。例如， $z^-y^+a^+$ 变种是指缺少 $\beta$  半乳糖苷酶，而有正常量的其余二种酶的变种。然后又分离出最令人感兴趣的与三种蛋白质皆有关的一类变种。这类变种称组成酶变种，它们在诱导物存在或不存在时皆能大量合成上述三种酶。雅各布，F. (Francois Jacob)和莫诺德，J. (Jacques Monod) 由此推论认为，这三种蛋白质的合成速率是由一个与决定它们结构的基因无关的共同成分所控制。这个共同调节成分的基因称为 $i$ 。野生型可诱导的细菌具有 $i^+z^+y^+a^+$ 基因型，而乳糖的组成酶变种的基因型为 $i^-z^+y^+a^+$ 。

$i^+$ 基因如何影响由 $z$ ， $y$ 和 $a$ 编码的三种蛋白质的合成速度？最简单的假说是， $i^+$ 基因决定了一个称为阻遏物的胞浆物质的合成，此物在 $i^-$ 变种中缺失或无活性。人们设计了一系列聪明的遗传学实验以证实上面的假说。他们使用部分二倍体细菌，其中含有双套为乳糖区编码的基因。一套基因是在细菌染色体上，另一套是通过结合作用连接在F'性因子上的。例如，人们分离得一个 $i^+z^-Fi^-z^+$ 的二倍体，其中 $i^+z^-$ 是在染色体上，而 $i^-z^+$ 是在附加体上。那么此二倍体对 $\beta$  半乳糖苷酶来说，是组成性的还是诱导性的？也可以这样提问，在细菌染色体上的 $i^+$ 是否将阻遏附加体上 $z^+$ 的表达？实验结果清楚地表明，此二倍体是诱导性的而非组成性的。用 $i^-z^+Fi^+z^-$ 二倍体做实验也得到同样结果。因此， $i^+$ 基因确能决定一个可扩散性阻遏物的产生。

操纵子是基因表达的协调单位

雅各布和莫诺德根据上述试验提出了调节蛋白质合成的操纵子模式。此模式中的遗传组分包括一个调节基因，一个操纵基因及一组结构基因（图28-3）。调节基因能产生作用于操纵基因的阻遏物。后知此阻遏物是一蛋白质。操纵基因邻接于它所控制的结构基因旁。阻遏物与操纵基因的结合能阻止结构基因的转录。操纵基因及与它有关

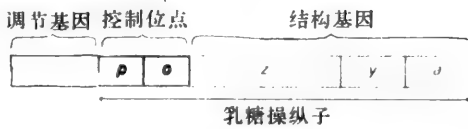


图28-3 乳糖操纵子及其调节基因图。(此图非按比例绘制， $p$ 及 $o$ 位点实际上比其它基因要小得多。)

的结构基因一起称为一个操纵子。对乳糖操纵子来说，*i*基因是调节基因，*o*基因是操纵基因，*z*、*y*及*a*是结构基因。另外，还有一个以*p*表示的启动子位点，即与RNA聚合酶的结合点。此转录的起源点紧接操纵基因。IPTG等诱导物与阻遏物结合，从而阻止后者与操纵基因相互作用。这样，*z*、*y*和*a*基因可被转录，产生单个为全部三种蛋白质编码的mRNA分子（图28-4）。能为多于一种蛋白质编码的mRNA分子即称为多基因（多顺反子）转录本。

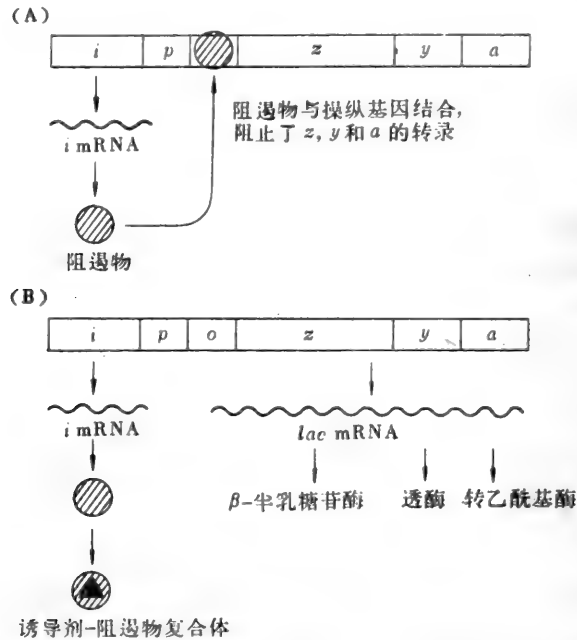


图28-4 乳糖操纵子 (A) 受阻遏, (B) 被诱导状态图。

### *lac*阻遏物是四聚体蛋白质

利用乳糖操纵子的阻遏物（称*lac*阻遏物）能与IPTG结合的性能，已将它分离出来。吉尔伯特，W. (Walter Gilbert) 和缪勒·希尔，B. (Benno Müller-Hill) 证明*lac*阻遏物是一蛋白质，它能与带有*lac*操纵子的DNA结合，而不与其他的DNA结合。诚如预期，*lac*阻遏物与*lac*操纵基因DNA的结合受到IPTG的阻止。一个野生型大肠杆菌细胞只含约十个分子*lac*阻遏物。因为它只占总蛋白质质量的0.001%，因此很难从此类细胞中将其提纯。但可以从一种*i<sup>sq</sup>*变种（它们可能具有对*i*基因更有效的启动子）中得到多量*lac*阻遏物。更多的*lac*阻遏物还可以从带有*lac*区的转导性噬菌体中获得。这类受感染的大肠杆菌细胞中含有约二万个阻遏物分子（约占总蛋白的2%），因此是提纯*lac*阻遏物的首选原料。

*lac*阻遏物是由四个相同的37kda亚基组成，每个亚基皆有一个诱导剂结合位点。其对IPTG的离解常数约为 $10^{-6} \text{ mol/L}$ 。阻遏物与操纵基因的结合迅速而牢固。阻遏物-操纵基因复合物的离解常数约为 $10^{-13} \text{ mol/L}$ 。这个高亲和力是必要的，因为在野生型大肠杆菌细胞中只有很少几个分子的阻遏物。它们结合的速度常数很高，约为 $7 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。这提示可能阻遏物是沿DNA分子扩散过来（单向寻找）以寻觅操纵基因位点，而不是在水的

介质中与操纵基因相遇（三向寻找）。

*lac*操纵基因具对称性碱基顺序

由于可获得纯化的*lac*阻遏物，因此*lac*操纵基因也得到了分离并确定了其碱基顺序。吉尔伯特及其同事将带有*lac*区的噬菌体DNA用超声捣碎成约一千个碱基对长的许多片段。将*lac*阻遏物加入此片段混合物中，然后用硝酸纤维素膜过滤。未与*lac*阻遏物结合的片段可被滤过，而DNA-阻遏物复合体则牢固附着于膜片。结合的DNA可用IPTG使之释放。放出的DNA在阻遏物存在下用胰脱氧核糖核酸酶处理。此步骤的根据是设想当操纵基因与阻遏物复合时，此区会受到保护而不致被胰脱氧核糖核酸酶水解（图28-6）。这些操纵基因片段的碱基序列就可通过测定其RNA转录本的顺序加以确定。此区的碱基顺序十分有趣，它含有以二重对称轴相互关联的共28个碱基对（图28-7）。

可能阻遏物的对称性是与操纵基因的对称性相匹配的。这一识别的原理也适用于转录过程的终止信号（527页）和放线菌素D（一种肽类抗菌素）与DNA的结合（479页）。

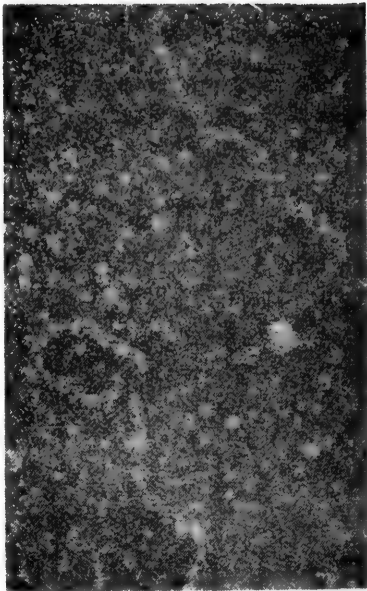


图28-5 *lac*阻遏物与含有*lac*操纵基因的DNA结合的电镜图。[蒙Dr. Jack Griffith 特许。]

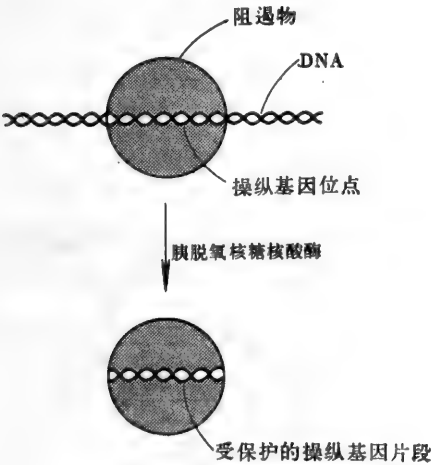


图28-6 *lac*阻遏物保护*lac*操纵基因免受胰脱氧核糖核酸酶消化。

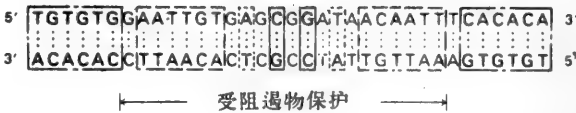


图28-7 *lac*操纵基因的核苷酸顺序。对称关系区用同种线框示出。

环AMP刺激若干诱导性分解代谢操纵子的转录

以葡萄糖培养的大肠杆菌只含很少量的分解代谢酶，（如 $\beta$ 半乳糖苷酶，半乳糖激酶，阿拉伯糖异构酶及色氨酸酶），这是久知的事实。当葡萄糖充沛时，合成这些酶显然是一个浪费。葡萄糖具有的这种抑制作用称为分解代谢产物阻遏，它的分子基础已经阐明。其中一个

关键情况是葡萄糖使大肠杆菌中的环腺苷酸浓度降低。后又发现外源性的cAMP(环腺苷酸)可解除葡萄糖引起的阻遏。生物化学及遗传学的研究进一步指出,cAMP能刺激许多种诱导性操纵子的起始转录。

无葡萄糖存在下形成的cAMP可与CAP结合,CAP是分解代谢物基因激活剂蛋白质(carabolite gene activator protein),它是一个含22kda

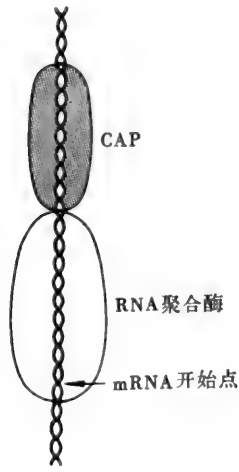


图28-8 DNA模板上的CAP及RNA聚合酶示意图。由核酸酶消化实验中获得这些蛋白质的定位。

亚基的二聚体。**CAP**与**cAMP**的复合体能够(**CAP**单独不能)通过与某些启动子位点结合而刺激转录。在*lac*操纵子中,用脱氧核酸酶消化实验证明,CAP结合在RNA聚合酶结合位点之旁。更明确地说,即CAP保护-87至-49核苷酸使不被消化,RNA聚合酶保护-48至+5核苷酸(图28-8)。用此编号法时,第一个转录的核苷酸称+1。被CAP识别的DNA碱基序列含有一个二重对称轴,这种情况在蛋白质DNA相互作用中经常出现。CAP如何刺激*lac* mRNA的合成使达50倍之多?**CAP**以及RNA聚合酶的结合位点相连而不重迭。这一事实提示,**CAP**与**DNA**的结合创造了一个新的RNA聚合酶作用位点。相反,*lac*阻遏物结合在-3至+21核苷酸段,与RNA聚合酶位点(-48至+5)有显著重迭。因此,阻遏物妨碍了RNA聚合酶的进入从而阻止了起始。cAMP-CAP复合物可能对其它诱导性操纵子有同样作用。因此,诱导性操纵子活动的控制是以cAMP及特异诱导物为信号分子,通过各种互补机制而实现的。

### 不同形式的同一蛋白质能活化和抑制阿拉伯糖操纵子的转录

阿拉伯糖可被细菌利用作为燃料。通过阿拉伯糖异构酶,核酮糖激酶及核酮糖5-磷酸差向异构酶的依次作用,阿拉伯糖转变为戊糖磷酸途径的中间产物,木酮糖5-磷酸(256页)。上述酶分别由*araA*,*araB*,*araD*基因编码。这些结构基因与启动基因(*araI*)和操纵基因(*araO*)一起,构成了阿拉伯糖操纵子(图28-9)。此操纵子由*araC*所调节,*araC*位于紧接操纵基因部位处。阿拉伯糖操纵子与乳糖操纵

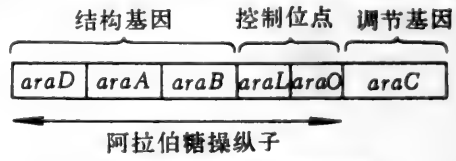
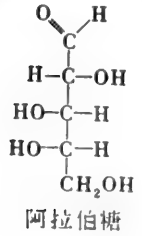


图28-9 阿拉伯糖操纵子及其调节基因图。



子一样,能被CAP-cAMP复合体所活化。诚然,阿拉伯糖操纵子是首先发现的即有正向又有反向调节的操纵子。*araC*的产物是一个具二种不同功能构象(称P1及P2)的蛋白质。无阿拉伯糖存在时,此蛋白质起阻遏物作用(P1)。P1构象与操纵基因结合而阻止了操纵子的转录。阿拉伯糖可将P1从操纵基因上移开,并使二构象间的平衡移向P2。P2是激活物形式。P2和CAP cAMP复合体一起结合在启动基因部位上,从而促使RNA聚合酶

开始转录。由此可见，同一调节蛋白质既起正向又起反向调节作用。

### 色氨酸操纵子的转录同时受到操纵基因 及衰减基因的控制

亚诺夫斯基, C. (Charles Yanofsky) 及其同事在研究大肠杆菌的色氨酸操纵子时发现一个新的控制组分。这个操纵子的7kb mRNA转录本为使分支酸转变成色氨酸 (381 页) 的五种酶编码。当此多顺反子 *trp* mRNA 被翻译时, 这五种蛋白质一个个依次协调地以等摩尔的量进行合成。翻译在转录完成前即开始。*trp* mRNA 在大约四分钟内就合成了, 以后快速地分解。*trp* mRNA 的寿命期短, 只约三分钟。这使细菌能对它们的不断改变的色氨酸需要迅速地作出反应。事实上, 大肠杆菌可使它的色氨酸合成酶系的产生速度在 700 倍范围内变化。

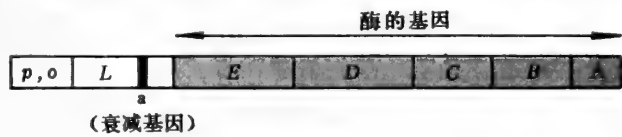


图28-10 *trp* 操纵子图, 示启动基因 (*p*), 操纵基因 (*o*) 和衰减基因 (*a*) 控制位点, 并示领先段 (*L*) 和色氨酸代谢途径中五种酶 (*E, D, C, B* 和 *A*) 的基因。

这种调节如何实现? 一个控制水平是特异阻遏物与DNA上的色氨酸操纵基因部位的相互作用。*trp* 阻遏物是由距 *trp* 操纵子较远的 *trpR* 基因编码的一个58kda1蛋白质, 阻遏物单独不能与操纵基因结合, 但它和色氨酸的复合物与操纵基因结合得十分牢固。或可以说, 色氨酸是辅阻遏物。色氨酸阻遏物复合物的靶标是一个具有二重对称性的DNA序列 (图28-11)。这又一次提出对称性在蛋白质与DNA相互作用中的重要作用。这个操纵基因位点与转录起始的启动基因位点有重叠。因此, *trp* 阻遏物与操纵基因的结合阻止了RNA聚合酶与 *trp* 启动基因的结合, 因而 *trp* 基因就不被转录。

过去一直认为, 终产物对色氨酸合成途径中第一个酶催化活性的抑制 (385 页), 以及阻遏物-操纵基因对转录的抑制足以解释色氨酸生物合成中大部分调节现象。然而一个未预料到的发现使这观点突然改变。人们发现有些变种在其操纵子内操纵基因与第一个酶 (*trpE*) 基因之间有缺失段。这些变种能增量生产 *trp* mRNA。对 *trp* mRNA 的5'端的顺序分析指出, 在 *trpE* 始动密码子前有一段162个核苷酸的领先序列。后来发现, 增高 *trp* mRNA 水平的缺失变种的缺失处于领先序列中, 约在 *trpE* 开始前30—60个核苷酸位置上。进一步令人瞩目的发现是: 当色氨酸水平高时, 产生的转录本只含领先序列中的头130个核苷酸; 而当色氨酸缺少时, 所合成的 *trp* mRNA 共含7000个核苷酸并包括全部领先序列。因此, 亚诺夫斯基总结为, *trp* 操纵子的转录必由一控制性终止位点所调节, 此位点称衰减基因, 处于操纵基因与途径中第一个酶的基因之间。衰减基因是生理上的调节终止位点, 它和某些操纵子终端的

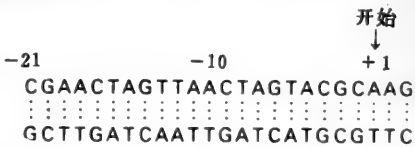


图28-11 *trp* 操纵基因的碱基序列。二重对称轴以圆点标出。以+1标出的碱基对是操纵子转录部分开始处。

终止位点一样（476页），具有一段富含GC顺序，紧接着又有一个富含AT顺序。衰减基因中每个这类区域皆有二重对称轴（图28-12）。而且，领先转录本以一系列U为终端。

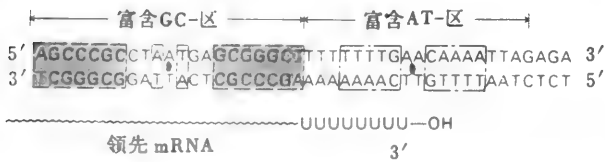


图28-12 *trp*衰减基因位点的碱基序列。富含GC区的碱基对之间的二重轴对称以虚线框表示，富含AT区中的以点划线框表示。

当色氨酸充分时，色氨酸-阻遏物复合体与操纵基因的结合阻断了转录。当细胞中色氨酸水平下降时，阻遏开放，转录即开始。但是，在转录过程中有些RNA聚合酶分子在经过衰减基因位点时，有些则可继续转录完整的*trp*信使。而当色氨酸逐步不足时，通过衰减基因位点继续进行合成的RNA聚合酶的比率就增加。

### 衰减作用由领先mRNA的翻译所介导

*trp*操纵子中的衰减基因位点如何感受到细胞内色氨酸水平的改变？一个重要的线索是发现了领先mRNA可部分地被翻译。领先多肽含十四个氨基酸残基，而其第11及12位的色氨酸十分令人注意（图28-13）。当色氨酸充沛时，完整的领先多肽被合成。但当色氨酸不足时，

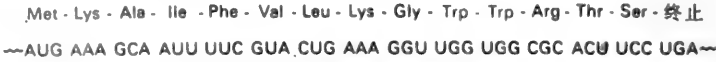
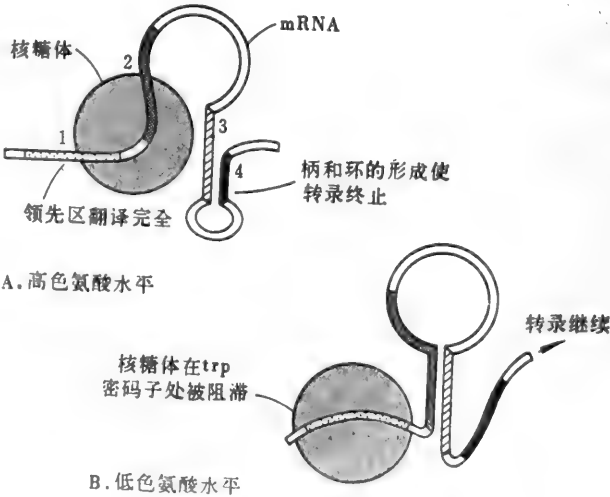


图28-13 *trp*领先多肽的氨基酸顺序及相应的领先mRNA的碱基顺序。

由于色氨酸tRNA的贫乏，核糖体在相连的UGG密码子处被阻滞。被阻滞的核糖体也许使mRNA的结构发生改变，因而RNA聚合酶就超越衰减基因位点而继续转录操纵子。这一控

图28-14 大肠杆菌*trp*操纵子衰减作用模式图。当色氨酸丰富时（A）*trp* mRNA的领先区（第1段）被完全翻译。第2段与核糖体作用，使3、4段碱基配对。此碱基配对区以某种方式指令RNA聚合酶终止转录。相反，当色氨酸不足时（B）由于核糖体被阻滞于第1段的*trp*密码子处，第3和第4段不能相互作用。第2段不被拉入核糖体，却与第3段作用，使3和4段不能配对。结果是转录继续。[依据D. L. Oxender, G. Zurawski, and C. Yanofsky, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76 (1979): 5524.]



制机制的关键是翻译和转录密切偶联。翻译 *trp* 领先 mRNA 的核糖体紧紧追随着转录 DNA 模板的 RNA 聚合酶分子。近期研究指出, 被阻滞的核糖体转变了 mRNA 的二级结构, 由有利于终止转录的碱基对布局变成全然不同的、容许 RNA 聚合酶跨经衰减基因位点继续工作的布局 (图28-14)。我们逐渐认识到, 核酸分子和蛋白质分子一样, 能通过改变构象而被调节, 这是有深远生理意义的。

组氨酸操纵子的衰减基因位点含有  
相连的七个组氨酸密码子。

现知大肠杆菌中还有两个氨基酸生物合成的操纵子也有衰减基因位点。苯丙氨酸操纵子和组氨酸操纵子, 与色氨酸操纵子一样, 在第一个酶基因之前含有受调节的终止位点。同样, 终止位点之前有一个被翻译的领先区。苯丙氨酸操纵子的领先多肽的氨基酸顺序很有特点: 15个残基中有7个是苯丙氨酸残基 (图28-15)。更值得注意的是, 组氨酸操纵子的领先多肽含有7个相连的组氨酸残基。显然, 这些领先 mRNA 是为感测苯丙氨酸及组氨酸的水平而设计的。如相应的结合 tRNA 缺乏, 领先区的翻译就停止。正象前面在 *trp* 操纵子中论及的, 一般认为被阻滞的核糖体可使 mRNA 的构象转换, 使其碱基配对状态变成容许 RNA 聚合酶识别和通过衰减基因位点。在组氨酸操纵子领先 mRNA 中, 出现7个相接的组氨酸密码子, 大大地加强了此一监测系统的灵敏度。事实是, 当组氨酰 tRNA 水平降低15%时, 从该操纵子转录的 mRNA 分子数就会增高三倍。

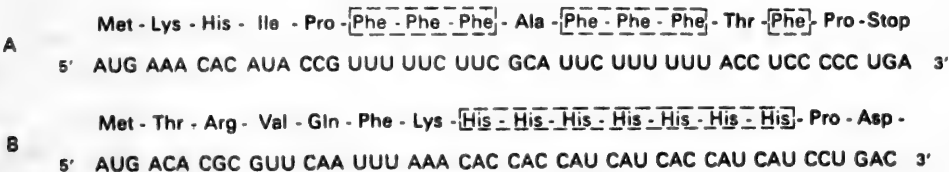


图28-15 领先多肽的氨基酸序列及相应 mRNA 部分的碱基顺序。  
A. 苯丙氨酸操纵子;  
B. 组氨酸操纵子。

阻遏物和激活剂主宰温和噬菌体的发育

我们现在转入讨论转录的阻遏物和激活剂在调节  $\lambda$  噬菌体 (图28-16) 生活周期中的作用。成熟的病毒颗粒由一线形双螺旋 DNA 分子 (48kb), 周围绕以蛋白质外壳组成。此病毒有两种发育途径: 将其宿主杀灭或成为宿主一部分 (因此称温和病毒)。在溶解途径中, 病毒的功能完全地表现出来, 导致细菌的溶解并爆发性地产生近100个子代病毒颗粒。另一可能是  $\lambda$  噬菌体进入溶原途径, 即其 DNA 以共价形式在一个特定点插入宿主细胞 DNA 中。关于环形  $\lambda$  DNA 分子的这一重组过程将在后面讨论 (579 页)。当病毒 DNA 整合到宿主 DNA 中后, 其大部分噬菌体功能皆被关闭。在此状态的病毒 DNA 称为原噬菌体; 含有原噬菌体的宿主细胞称溶原性细菌。在溶原细菌中, 原噬菌体可作为宿主染色体的一部分进行复制, 常可传数代之久。在溶原状态下,  $\lambda$  的溶解功能并未丧失而只是处于潜伏态 (图28-17)。各类



干扰宿主DNA复制的物质能诱导原噬菌体进入溶解发育过程。

先讨论 $\lambda$ 噬菌体在溶解途径中基因表达的类型。为了生产大量子代，**病毒的基因依次被**

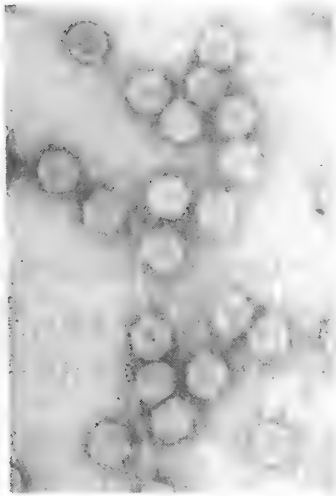


图28-16  $\lambda$ 噬菌体的电镜图。[蒙Dr. A. Dale Kaiser特许。]

**转录。**首先生成的是DNA复制及重组中所需的蛋白质，然后再合成病毒颗粒的头和尾蛋白质以及溶解宿主细胞所需的蛋白质。紧要的是时间表，过早地破坏宿主对病毒显然是不利的。溶解途径的基因表达分三个阶段：即早期、延早期和晚期（图28-18）。在**即早期**，RNA合成在两个启动子位点 $P_L$ 及 $P_R$ 开始。其中一个转录本是有关键性调节作用的N蛋白的模板。N蛋白不存在时，即早期的转录本可在两个终止位点之一处终止。N蛋白的作用是对抗在这些位点上转录的终止，从而使 $\lambda$ 基因的表达得以继续。N蛋白开动了**延早期**。在此期内合成的是 $\lambda$  DNA复制及重组所需的蛋白质。此外，Q基因也于此时被转录。Q蛋白是 $\lambda$ 中基因表达的另一个关键性调节物，是开动**晚期**的必要蛋白质。在晚期，形成噬菌体头和尾以及溶解宿主所必要的蛋白质的基因得到转录。Q蛋白和N蛋白一样，能对抗转录的终止。简言之，

溶解性发育的按序调节是通过两个正性调节蛋白质而实现。它们由**N**和**Q**基因所编码，使转录能顺利通过数个终止位点继续进行。

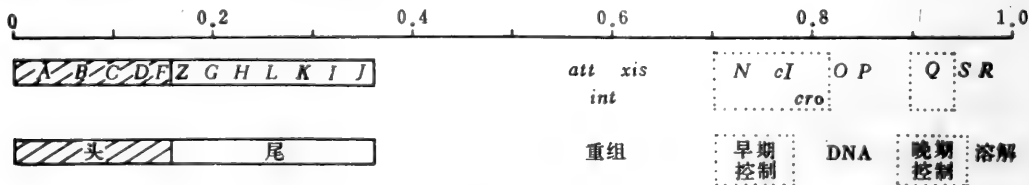


图28-17  $\lambda$ 噬菌体的基因图谱，只列出部分基因。此线形DNA双螺旋在进入细菌细胞后转变成环状。

溶原途径亦有三个阶段：**建立、维持和开放**。原噬菌体状态的建立要求病毒DNA与宿主DNA的整合及病毒溶解功能的失活。这些过程是复杂未明的。但原噬菌体形式的维持过

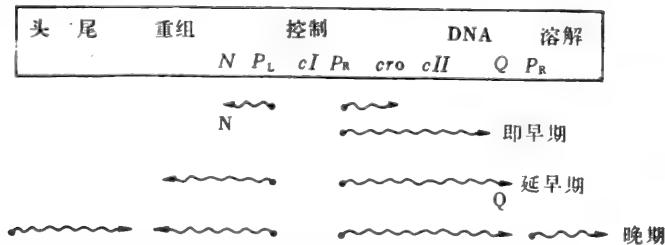


图28-18  $\lambda$ 噬菌体溶解性生长中转录的三个阶段。在即早期生成的N蛋白激活了延早期。依次生成的Q蛋白激活晚期。[依据H. Echols, *The Bacteria* 8(1979):502.]



程比较简单。凯泽, A.D. (A.Dale Kaiser) 证明, 在原噬菌体中, 只有 *cI* 基因得到表达。此基因为  $\lambda$  阻遏物编码, 后者能与两个操纵基因区,  $O_L$  及  $O_R$  结合 (图28-19)。 $\lambda$  阻遏物与  $O_L$  的结合直接阻止了即早期基因的向左转录, 特别是 *N* 蛋白不能合成, 因而堵塞了解决途径。 $\lambda$  阻遏物与  $O_R$  的结合阻止了右方 *cro* 及 *Q* 基因等的表达。诚然,  $\lambda$  阻遏物与  $O_L$  及  $O_R$  的结合足以使除了 *cI* 基因 (为  $\lambda$  阻遏物编码) 之外的全部  $\lambda$  基因组呈静止态。即将谈到,  $\lambda$  阻遏物本身又控制 *cI* 基因, 即能自我调节其水平。 $\lambda$  阻遏物如被失活, 溶解途径基因就要进行转录。这时原噬菌体由宿主染色体上切下, 溶解功能即表达出来。

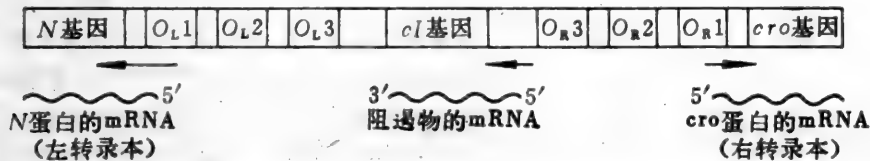


图28-19  $O_L$  及  $O_R$  操纵基因区及邻近基因图。 $O_L1$  及  $O_R1$  与  $\lambda$  阻遏物的亲和力最强。*cI* 是阻遏物基因。左转录本于 *N* 基因处开始。右转录本于 *cro* 基因开始。

### $\lambda$ 中的两个操纵基因皆含一系列阻遏物结合位点

$\lambda$  阻遏物已由普塔什恩, M. (Mark Ptashne) 分离出来并进行了详细的研究。其26kda的单体与寡聚体处平衡状态, 后者是与 DNA 结合的形式。 $O_L$  及  $O_R$  是两个操纵基因区, 皆能被同一  $\lambda$  阻遏物识别。为该阻遏物编码的 *cI* 基因处于  $O_L$  及  $O_R$  之间 (见图28-19)。每一操纵基因中皆含三个  $\lambda$  阻遏物的结合位点。核酸酶消化实验指明, 各结合位点皆长17碱基对并被3—7碱基对长的富含 A T 的区域分离开。这些对  $\lambda$  阻遏物的结合位点的碱基顺序相似而不尽相同。被识别的序列是5'-TATC ACCGC-3' 或类似序列。这些操纵基因位点和 *lac* 操纵基因位点一样, 也具有部分二重对称性。

在  $O_L$  和  $O_R$  中, 二者与阻遏物结合最强的位点是操纵子中与第一个结构基因最接近的那个位点。*N* 基因的启动子位点处于  $O_L$  之内; *cro* 基因的启动子位点在  $O_R$  之内。与乳糖及阿拉伯糖操纵子类似, 阻遏物与这些操纵基因的结合堵塞了 RNA 聚合酶与相应启动子结合, 因而转录无法开始。 $\lambda$  阻遏物与  $O_L$  或  $O_R$  中两个位点结合比与一个操纵基因结合能更有效地将 RNA 聚合酶排除在外。

### $\lambda$ 阻遏物调节其自身合成

在溶原化的大肠杆菌细胞中  $\lambda$  阻遏物的分子数是被精确调控的。如果阻遏物过少, 即使是暂时性的, 也将使细胞走向溶解途径。另一方面, 如果阻遏物过多, 则在出现细菌条件不适宜噬菌体生存时, 后者将难以解脱释放。 $\lambda$  阻遏物的水平由何控制? 近来的研究指出, 阻遏物自身调节其合成。特别是当阻遏物与  $O_R3$  这一离 *cI* 基因最近的操纵基因位点结合时, 就将 *cI* 基因的转录关闭 (图28-20)。相反, 阻遏物与  $O_R1$  的结合加强了 *cI* 的转录。我们记得  $O_R1$  与  $\lambda$  阻遏物的亲和力比  $O_R3$  的强。因此, *cI* 的转录被低  $\lambda$  阻遏物水平所加强, 而被高水平的同一蛋白所抑制。换言之, *cI* 基因的表达是自我调节的。

上述反馈线路使阻遏物水平得以维持，因而噬菌体基因组中的其它部分得不到表达。但

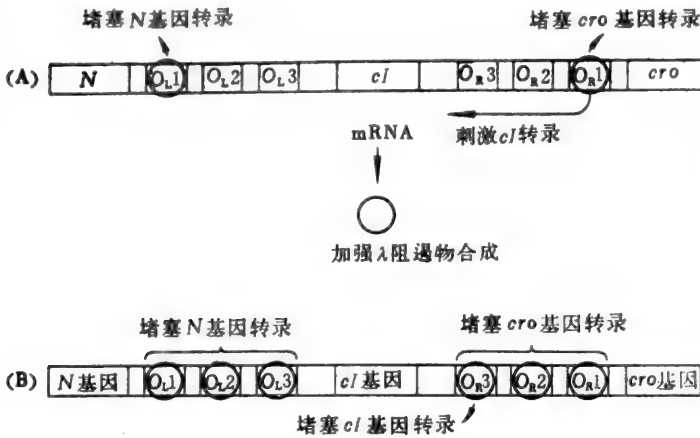


图 28-20  $\lambda$  阻遏物水平的自我调节。(A)当阻遏物水平低时，它与  $O_{R1}$  结合，刺激了  $cI$  的转录；(B)当阻遏物水平增高时，它与  $O_{R3}$  结合，抑制  $cI$  基因的进一步转录。

噬菌体又如何由溶原状解脱出来呢？引发的关键是  $\lambda$  阻遏物数量的减少，减少到足以使  $cro$  基因开始转录。新合成的  $cro$  蛋白就可与  $O_{R3}$  结合，以阻止  $cI$  基因的转录。重要的一点是  $O_{R3}$  与  $cro$  蛋白的亲合力大于  $O_{R1}$ 。因此， $cro$  蛋白水平低时可抑止  $\lambda$  阻遏物的合成但不关闭  $cro$  蛋白自身合成。这样， $\lambda$  阻遏物就不能再占上风。此时，一连串导致溶解的过程就不可逆地运转起来了。所以说，几个蛋白质和几个操纵子位点间的奥妙的相互作用决定了此

噬菌体的发育途径。这种与蛋白质有不同亲和力的多操纵子位点的调节机制，是否普遍地在控制原核生物发育中占重要地位，是值得注视的问题。

## 概 要

细胞以各种不同方式调节其合成的蛋白质的数量。在大肠杆菌中，基因表达的调节主要是在转录水平而非在翻译水平。许多基因组合起来成为操纵子，后者是遗传表达的协调单位。操纵子包括控制位点（一个操纵基因及一个启动基因）和一套结构基因。处于操纵子之外，有一个调节基因，它编码一个与操纵基因位点相互作用的蛋白质。乳糖操纵基因具有对称性的碱基序列。一般而论，对称性对蛋白质识别 DNA 上特异位点起重要作用。 $lac$  操纵子可被诸如别乳糖和 IPTG 之类的  $\beta$ -半乳糖苷所诱导。诱导剂与  $lac$  阻遏物的结合导致后者从操纵基因上脱下。RNA 聚合酶然后就能经过操纵基因以进行  $lac$  操纵子的转录。色氨酸操纵子被色氨酸所阻遏，后者与特异阻遏物结合使之能与操纵基因作用。结果是关闭了编码色氨酸生物合成所需基因的转录。

有些氨基酸合成的操纵子，包括  $trp$  操纵子，同时还受衰减基因位点的控制。当终产物氨基酸充裕时，转录终止于衰减基因位点。衰减作用通过领先 mRNA 的翻译而实现。cAMP 有广泛的控制效应，因为它能与特异蛋白质 CAP 结合。生成的复合物与几种诱导性操纵子的启动基因位点作用从而激活转录的起始。只有当葡萄糖缺乏时，cAMP 水平才会增高。因此，葡萄糖间接地抑止了一系列分解代谢酶的合成。

$\lambda$  噬菌体可繁殖和消灭其宿主（溶解途径）或者其 DNA 可以整合进入宿主 DNA（溶原途径）。在溶解途径中，三组基因依次转录。在即早期形成的 N 蛋白激活了延早期基因的转录，后一过程再产生 Q 蛋白，它依次又激活后期转录。溶原途径是由  $cI$  基因编码的  $\lambda$  阻遏物来维持。这个阻遏物与  $O_L$  及  $O_R$  操纵基因结合并阻止即早期基因的转录。在这些操纵基因中

存在多种结合位点, 因此 $\lambda$ 阻遏物能自我调节其合成。

## 习 题

- 下列突变各产生什么效应?
  - $lac$ 调节基因缺失
  - $trp$ 调节基因缺失
  - $ara$ 调节基因缺失
  - $\lambda$  中  $cI$  基因缺失
  - $\lambda$  中  $N$  基因缺失
- $lac$ 操纵子的超阻遏变种 ( $i^s$ ) 表现为不诱导性的变种。在全二倍体中  $i^s$  基因与  $i^+$  相比是显性。这种变异的分子本质会是怎样的?
- 一个大肠杆菌变种, 在诱导剂存在或不存在时皆能合成大量 $\beta$ -半乳糖苷酶。由此变种和  $Fi^+o^+s^-$  形成的不全二倍体, 在诱导剂存在或不存在时, 也能合成大量 $\beta$ -半乳糖苷酶。哪类变异会产生这样的结果?
- 从野生型培养中分离得到的一个变种, 它不能利用半乳糖、乳糖、阿拉伯糖及其它一些碳源。在此变种中环腺苷一磷酸水平正常。哪类变异会引致这种结果?
- 一个带有 $\lambda$ 原噬菌体的大肠杆菌细胞, 具有不受 $\lambda$ 溶解性感染的免疫力, 为什么?
- $cI$ 的转录可由  $p_{RE}$ 点起始 ( $p_{RE}$ 是阻遏物建立的启动基因), 亦可由  $p_{RM}$ 起始 ( $p_{RM}$ 是阻遏物维持的启动基因)。 $\lambda$ 阻遏物的  $p_{RM}$ 转录本由其5'端AUG密码子开始, 而在  $p_{RE}$ 转录本中, 其起始密码子之前有一个与16S rRNA的3'端互补的碱基顺序。在  $p_{RE}$ 位点起始的转录需要一些在溶源态中不表达的由噬菌体编码的蛋白质。
  - 哪一个转录本可更有效地被翻译?
  - 这个差别可能有什么生理意义?另外的习题, 参见 L. E. Hood, J. H. Wilson and W. B. Wood, *Molecular Biology of Eucaryotic Cells* (Benjamin, 1975), ch.1.

## 第29章 真核生物染色体和基因表达

真核生物比原核生物含有多得多的遗传信息。例如,人细胞含DNA比大肠杆菌细胞多一千倍,比 $\lambda$ 噬菌体多十万倍。由于富含DNA,真核生物具有原核生物所无的许多潜能。另一



图29 1 卵细胞中一个灯刷染色体的相差显微镜图。[蒙Dr. Joseph Gall特许。]

差别是高等生物的DNA与碱性的组蛋白结合存在,而低等生物的DNA则否。碱性蛋白的作用是将DNA密集起来,使全长由数厘米卷缩成几个微米。在光学显微镜下,真核染色体的形态十分清楚,它们比原核基因组具更高级的组织结构性。此外,真核染色体的形状在细胞周期中有显著变化。然而,事实上最主要的差别——真核生物与原核生物的分界线——是真核染色体由一层核膜所包围,而在原核生物中,这膜和其它内膜皆不存在。因此,一个重要的后果是:在真核生物中,转录及翻译在时间和空间上是分隔的,而在原核生物中是紧密偶联着的。在高等生物中,初转录本要在核内经广泛的修饰,裂解及拼接。核中合成的RNA仅一小部分作为mRNA出现于胞液。很明显,真核生物的基因表达比原核生物要丰富及复杂得多。这个领域正在迅速发展,因为真核基因现已能被分离、无性繁殖(克隆)和测定顺序,而且能在明确的系统中得到表达。人们对此感到十分振奋,因为生物学中的一个基本问题——细胞分化机制,可能即将被揭晓。

### 一个真核染色体含有一个双螺旋DNA分子

一个染色体是否含有一个长DNA分子?多年来这是个难以解答的重要问题,因为巨大的DNA分子对剪力降解极为敏感。齐姆, B. (Bruno Zimm)设法绕过这一难关,利用了粘弹性(viscoelastic)技术,使测量混合体中的最大DNA分子的大小成为可能。方法是先使DNA分子流动从而伸展开来,然后容其缩回复原。缩回所需时间(或一半时间)与其分子量相关。在果蝇实验中,可将细胞置于测量室中使之溶解,这样可避免在转移样品中折损DNA。为了消除核酸酶活性,样品与去污剂同置于65℃保温,并加入链霉蛋白酶以消化去除与DNA结合的蛋白质。

在此混合物中观察到的最大DNA的质量是 $41 \times 10^9$  dal。这数据与已知黑腹果蝇最大染色体的DNA含量—— $43 \times 10^9$  dal很近似。这最大染色体有一个移位变种(它多含一段DNA),对它的观察也得到相符的结果,即此变种的DNA含量为 $59 \times 10^9$  dal,而测出的此DNA分子

质量为 $58 \times 10^9$  dal。黑腹果蝇 DNA 的放射自显影图(图29 2)也证实存在着一个很长的DNA分子。以上研究说明：一个果蝇 染色体含有一个完整的DNA分子，此分子呈线形，无分枝。



图29-2 黑腹果蝇DNA分子的放射自显影图。此DNA分子的轮廓长1.2cm。 [引自R . Kavenoff, L.C.K lotz, and B.H. Zimm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant .Biol.* 38 (1974): 4.]

真核细胞DNA与称为组蛋白的碱性蛋白质紧密结合

真核染色体中的 DNA 并非裸露,而是与一类小的碱性蛋白质——组蛋白紧密结合着。事实上，真核染色体质量中约一半是组蛋白，另一半是DNA。染色体的这个核蛋白物质即称为

表29-1 组蛋白种类

种类	Lys/Arg比	残基数	质量(kdal)	部位
H 1	20.0	215	21.0	连接物
H 2 A	1.25	129	14.5	核心
H 2 B	2.5	125	13.8	核心
H 3	0.72	135	15.3	核心
H 4	0.79	102	11.3	核心

染色质。以盐或稀酸处理染色质可使组蛋白由 DNA 上解离，形成的混合物可用离子交换层析法分开。组蛋白有五种，称H1，H 2 A，H 2 B，H 3和H 4。其质量为11—21 kdal（表29-1）。组蛋白的突出点是含有许多带正电荷侧链，每四个氨基酸残基中大约就有一个赖氨酸或精氨酸。

由于翻译后侧链上的修饰作用，各种组蛋白皆可以不同形式存在。例如，H 4 中的第16位赖氨酸常是乙酰化的。组蛋白亦可被甲基化,ADP-核糖化及磷酸化。这种共价修饰作用可改变组蛋白的电荷性质，氢键形成能力及其形状，从而会影响 DNA 复制和转录的机会。

所有植物及动物中的组蛋白 H3和H4 的  
氨基酸顺序几乎相同

史密斯, E . (Emil Smith) 及德兰吉, R . (Robert Delange) 已验明豌豆苗的 H4 和小牛胸腺H4 的102个氨基酸残基中只有二个位置不同。而且此二处的差别很小：缬氨酸代替了异亮氨酸，赖氨酸代替了精氨酸。因此，在植物与动物趋异后的 $1.2 \times 10^9$ 年中，H4 的氨基酸顺序几乎维持恒定。同样，H3 在此长期进化过程中，也没有什么改变。豌豆苗H3 和小牛胸腺H3 的氨基酸顺序只在四处不同。将这些组蛋白在进化过程中的改变速度与其它蛋

白质加以比较, 是很有趣的。有用的指标称单位进化期, 即在二个进化趋异后, 氨基酸序列改变 1% 所需的时间。对 H3 来说这时间是 3 亿年, H4 是 6 亿年, 比迄今研究过的其它蛋白质的都长得多。如细胞色素 c 的单位进化期是二千万年, 血红蛋白是六百万年, 而血纤维蛋白肽是一百万年。H3 及 H4 结构的高度保守性雄辩地指出, 它们的关键作用在真核生物进化史的早期就已奠定, 并且一直几乎保持不变。

10	10
15	15
20	20
25	25
30	30
35	35
40	40
45	45
50	50
55	55
60	60
65	65
70	70
75	75
80	80
85	85
90	90
95	95
100	100
105	105
110	110
115	115
120	120

图 29-3 小牛胸腺 H4 组蛋白的氨基酸序列。几个残基被修饰过。α-氨基和赖氨酸 16 的 ε-氨基都是乙酰化的。赖氨酸 20 的 ε-氨基被甲基化或二甲基化。豌豆苗组蛋白 H4 有相同顺序, 仅残基 60 是异亮氨酸, 残基 77 是精氨酸。

**200个碱基对和H2A, H2B, H3及H4 蛋白各两个组成。**现已知这些重复单位即为核小体。DNA 大部分绕在由组蛋白组成的核心外面。余下的 DNA 称作联系段, 它们将相邻的核小体连接起来并使染色质纤维获得弹性。因此, 可认为染色质纤维犹如一串珠链, 是一条具弹性关节的核小体链子。

染色质的这一结构模式有广泛的实验依据:

1. **电子显微镜图** 在染色质电子显微镜图中可以看到直线排列的 100Å 直径的小球, 由一细索相连 (图 29-4)。染色质纤维伸展的程度则依电镜样品制备方法的不同而异。用其它制备方法所得电镜图中, 100Å 小球则较密集。因此, 电镜结果直接支持了染色质的上述结构概念。

2. **x-射线及中子衍射** 在染色质纤维的 x 射线衍射图中也见到 100 Å 的重复性。中子衍射研究则指出 DNA 处于核小体之外部。

3. **核酸酶消化** 游离于溶液中的 DNA 可以在任一磷酸二酯键处被胰脱氧核酸酶 I (DNA 酶 I) 或微生物核酸酶水解。相反, 染色质中的 DNA 则受到保护, 仅在少数几处被消化。染色质消化后的图谱很简单, 显出排成阶梯状的一系列区带

## 核小体是染色质的重复单位

组蛋白怎样与 DNA 相互作用形成染色质纤维? 1974 年, 科恩伯格, R. (Roger Kornberg) 根据几方面的证据提出, 染色质是由一些重复单位构成, 每一单位由 DNA 的

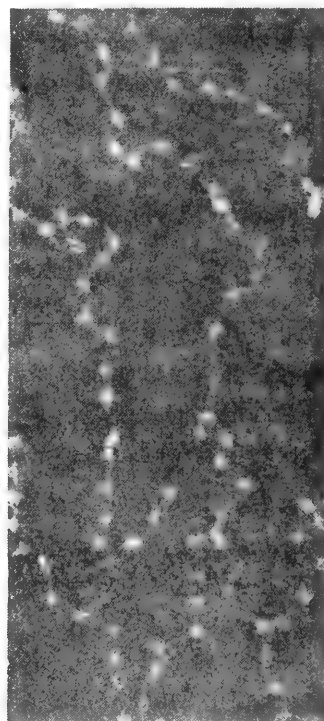


图 29-4 染色质的电镜图。球状颗粒的直径约 100 Å。[蒙 Dr. Ada Olins and Dr. Donald Olins 特许。]

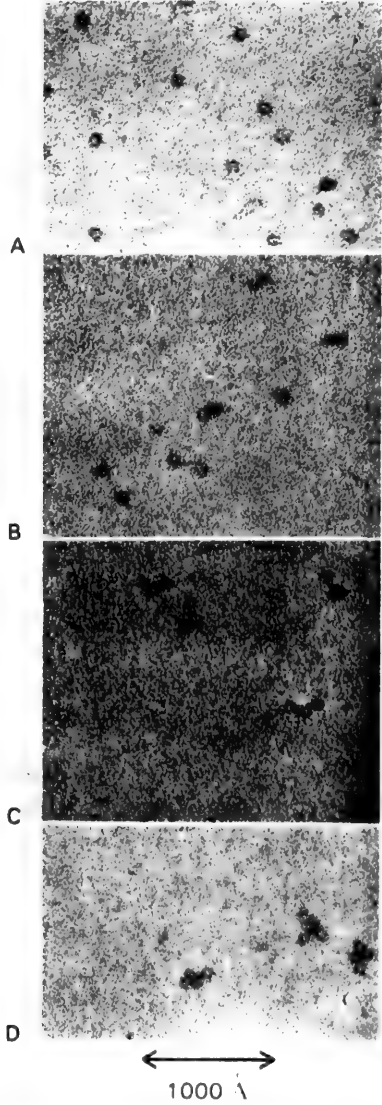
(图 29-5)。在这些片段中，DNA 含量皆等于由约200碱基对组成的基本单位的倍数。电镜图又显示，在一个染色质片段中，球形颗粒的数目即等于200碱基对单位的个数（图29-6）。例如，具有600个碱基对的 DNA 片段含有 3 个100Å 直径颗粒。所以，在电镜中看到的小球即相当于由核酸酶消化确定的一个核小体。

4. 重建 在体外，将组蛋白加到由腺病毒或猴病毒40(SV 40)中取得的DNA中去，就可得到似染色质的纤维。在此重建系统中，与一个核小体缔合的 DNA 的量亦接近200个碱基对。还看到，在形成核小体时，需要等摩尔数量的H 2A，H 2B，H 3及H 4。如在重建混合



图 29-5 经微球菌核酸酶不完全消化后所得的具一定长度的染色质片段的凝胶电泳图。(A)是未分部的消化液。经蔗糖梯度离心分部后得(B)单体，(C)二体，(D)三体，及(E)四体。[引自J. T. Finch, M. Noll, and R. D. Kornberg. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (1975): 3321.]

液中少掉四个组蛋白中任一个，皆不能形成特征性小球。相反，小球的形成并不需要H 1。这点也与已知H 1不存在于任何真核细胞的核小体中的事实相符。x射线衍射研究也显示，必须将H 2A，H 2B，H 3和H 4加到DNA 中去才能重新获得染色质的衍射图型。



核小体核心由绕在组蛋白八聚体上含140个碱基对的DNA构成

不同生物和不同细胞型的核小体，其DNA含量不等，可含160至240个碱基对

图 29-6 如图 29-5 方法所得核小体的电镜图。(A)单体，(B)二体，(C)三体，(D)四体。[引自J. T. Finch, M. Noll, and R. D. Kornberg. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (1975): 3321.]



(表29-2)。这些差别的结构基础是什么？我们又一次可用核酸酶作为很有效的探针。核小体可进一步用微球菌核酸酶水解,这样,无论该核小体原来含有多少 DNA, 都可得到一个含140个碱基对 DNA 的核心颗粒 可能在所有的真核生物中,核小体核心皆近似。核心含有140个碱基对的DNA, 与一个组蛋白八聚体 (H2A, H2B, H3及H4各二个) 相结合。

现已制得核小体核心的结晶, 正在用电镜 (图29 7) 及x射线衍射进行分析 结晶颗粒的获得说明染色质核小体核心是相当均一的。克卢格, A. (Aaron Klug) 及芬奇, J. (John Finch) 发现此核心是扁平体, 大小为110×110×55Å; 由二层组成1-1/2圈的左手超螺旋, 螺距约28Å (图29·8)。

表29-2 核小体的DNA含量

细胞型	碱基对数目
酵母	165
HeLa细胞	183
大鼠骨髓	192
大鼠肝	196
大鼠肾	196
小鸡输卵管	196
小鸡红细胞	207
海胆原肠胚	218
海胆精子	241

DNA 中的140个碱基绕在核心外面, 形成



图29·7 核小体核心结晶的电镜图。在此六边形排列中, 相邻二核小体核心中心之间约距100Å。  
[引自J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes, R. S. Brown, B. Rushton, M. Levitt, and A. Klug. *Nature* 269 (1977): 31. ]

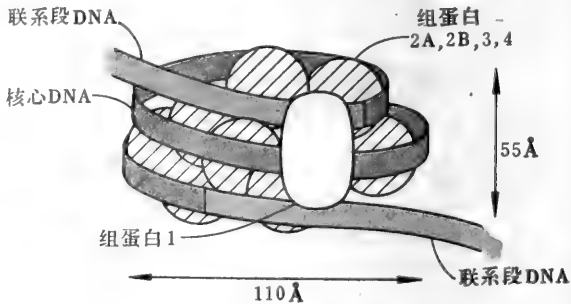


图29-8 核小体示意图。DNA 双螺旋 (深色带) 绕在组蛋白八聚体上 (2A, 2B, 3 和 4, 各两分子)。组蛋白1 (H1) 结合在核心颗粒外面及联系段DNA上。[依据*DNA Replication* by A. Kornberg, W. H. Freeman and Company, Copyright © 1980.]

如前所述,H1并不一定在核小体中存在。在共5种组蛋白中,H1的氨基酸顺序变化最多,它与其它组蛋白还在化学计量关系上有别,每个核小体中只含一个H1。此外,H1易从核小体中解离开来,这提示它处于外周地位而不参与核心的构成。事实上,当DNA由160碱基对被修减为140时,H1就从核小体上释出。因此可基本肯定,H1处于核小体外,靠近联系段DNA。H1可能在不同的核小体间起了桥梁作用,从而使染色质更加密实。

### 核小体是DNA紧缩的第一阶段

在核小体核心之外绕以DNA 这一结构方式有利于DNA 的贮装,因为这样就减缩了它的长度。在溶液中,一段有200碱基对的DNA 的长度约为680Å。相反,这些DNA都能纳入



直径为 $100\text{\AA}$ 的核小体中。这样,核小体的贮装比值(紧缩程度)为7。这个数值与染色体中DNA的紧缩程度对比又如何?人的中期染色体是高度紧缩的,它共含 $5.3 \times 10^9$ 碱基对,相当于廓长 $180\text{cm}$ 。这些DNA贮装成46个柱状体,后者总长只有 $200\mu\text{m}$ 。所以,在中期染色体中DNA的贮装比值约为 $10^4$ 。在间期细胞核中,染色质较为松散,其DNA的贮装比约为 $10^2$ 到 $10^3$ 。因此很明显,核小体不过是DNA紧缩过程的第一步。

DNA的再高级结构如何?一个可能是核小体本身再形成螺旋。有人提出如果染色质是一个有 $360\text{\AA}$ 直径的螺线管状体(图29 9),那么其贮装比就约为40。这些螺线管如再进一步盘绕成环就造成更大的紧缩。也有可能这类高级结构是由一系列非组蛋白所支持稳定。例如,去除了组蛋白的中期染色体呈现的图象是一个中央蛋白质支架,周围环列着许多极长的DNA环(图29 10)。这些DNA环可能结合于支架上。这种排列方式对染色体在有丝分裂或减数分裂时的移动可能有重要意义。

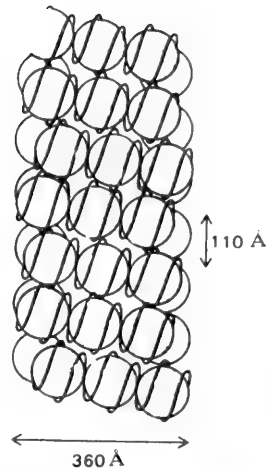


图29-9 建议的染色质螺线管模式。每圈螺旋含六个核小体(圆球),DNA双螺旋(黑线)绕在每个核小体之外。[依据J. T. Finch and A. Klug. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73(1976):1900.]

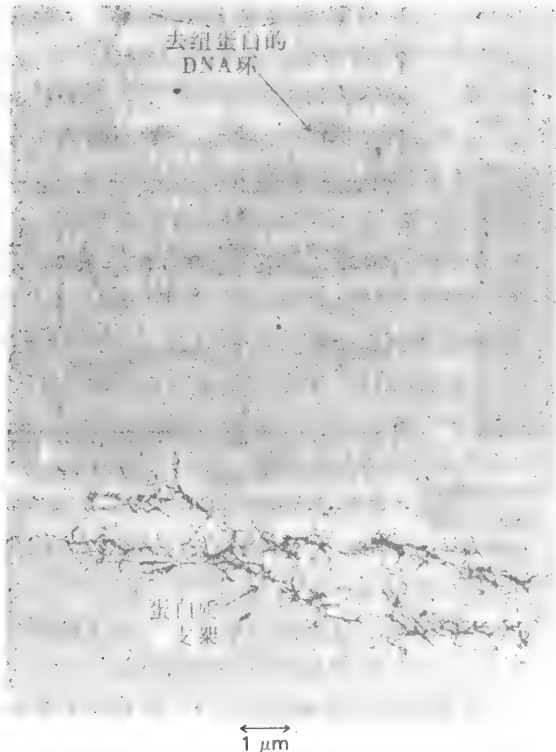
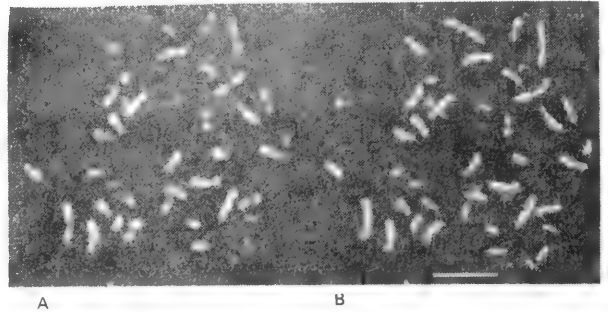


图29-10 电镜图示去组蛋白DNA附于一个中央蛋白质支架上。图为Hela细胞的中期染色体,经用多聚阴离子去除组蛋白。[蒙Dr. Ulrich Laemmli特许。]

## 真核细胞DNA的复制是多起点的双向复制

真核DNA和所有其它DNA分子一样是进行半保留复制。新复制出来的DNA在中期染色体的姊妹染色单体中也是半保留分布的(图29-11)。电镜研究还指出,真核DNA是由

图29-11 人男性中期染色体的荧光显微照相。染色体取自胸腺嘧啶同系物——5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)中复制二次的细胞。染色体先用奎吖因(Quinacrine)染色得(A),脱色后再用双苯嘧啶染料33258Hoechst重染得(B)。后一染料的荧光可被BrdU所淬灭,因此姊妹染色单体中的DNA如只有一条链中有BrdU取代,就比两条多核苷酸链中皆有BrdU取代的荧光更强。(图中横线长 $10\mu\text{m}$ ) [蒙Dr. Samuel Latt特许。]



**多起点进行的双向复制。**由于真核DNA长度很大,多起始点对快速复制很必要。例如,果蝇中最大的染色体长约 $2.1\text{cm}$ ,或含62,000千碱基对(kb)。果蝇中的一个复制叉仅以 $2.6\text{kb/分}$ 的速度移动,而大肠杆菌的速度是 $16\text{kb/分}$ 。如果复制仅从一个起始点开始,则果蝇最大染色体的复制将需要16天。实际上复制时间不到三分钟,因为在每一分子DNA中有多于6

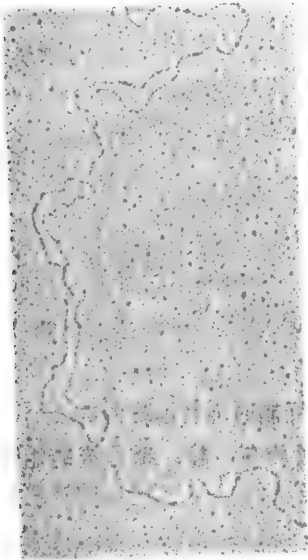


图29-12 果蝇分裂核中正在复制的染色体DNA的电镜图。洞眼是新生复制区。[蒙Dr. David Hogness特许。]

千个复制叉在协同作用。从破裂的果蝇核中提出的DNA分子,可显示一连串的复制区排布,或称“洞眼”(图29-12)。每个开始点的活动产生二个分枝的复制叉。许多洞眼都向两个方向扩展,最后合并形成两个子DNA分子(图29-13)。

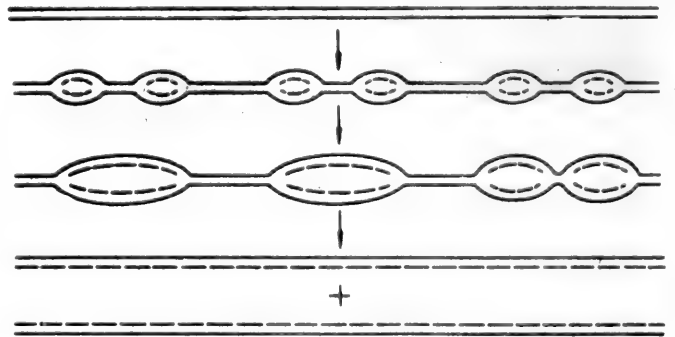


图29-13 真核染色体复制示意图。亲代DNA以实线表示,新复制的DNA以虚线表示。

尚未发现洞眼中再出现洞眼的情况,这指出一个起始点在全部分子DNA复制未完成前,不会再次活动起来。

真核细胞含三种DNA聚合酶(表29-3)。 $\alpha$ 聚合酶在染色体复制中起主要作用,而 $\beta$ 酶参与DNA的修复。当静止细胞开始迅速分裂时, $\alpha$ 聚合酶量升高十倍以上。 $\gamma$ 聚合酶负责线粒体DNA的复制。这些酶与原核细胞DNA聚合酶一样,利用脱氧核苷三磷酸作

为活化中间物，在模板指导下，使引物以5'→3'方向进行延长。所不同的是这些真核DNA聚合酶不具核酸酶作用。可能“校阅”功能是由与聚合酶集合在一起的、以多聚酶复合体形式存在的核酸酶来执行。

表29-3 真核细胞DNA聚合酶

种类	分布	主要作用	质量(kdal)
$\alpha$	核	核DNA复制	140
$\beta$	核	核DNA修复	40
$\gamma$	线粒体	线粒体DNA复制	150

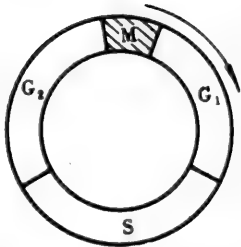


图29-14 真核细胞生命周期相：M（有丝分裂期）；G<sub>1</sub>（间隔期1，DNA合成前）；S（DNA合成期）；G<sub>2</sub>（间隔期2，居DNA合成及有丝分裂期之间）。各期时间长短依细胞类型及生长条件而不同。有丝分裂期常是最短时相。

新组蛋白在随从子代DNA双螺旋上生成新核小体

在复制叉处，DNA合成的总方向对一个子链来说，是由5'→3'，而对另一子链则由3'→5'。这个复制和原核细胞DNA的一样（452页），领先链的合成是连续的，而随从链的合成是断续的。那么原有的和新合成的组蛋白的分配又如何？这一问题可通过在亚胺环己酮（蛋白质合成的抑制剂）存在下进行DNA合成实验来回答。在此条件下，DNA合成可继续约15分钟，新合成的DNA，一半被DNA酶I全部降解，一半则被分解成含200碱基对的碎片。这个实验和密度标记实验一起，指出亲代组蛋白是与子代二个DNA双螺旋之一相结合，另一则由于无新组蛋白而裸露。电镜图也直接支持这一说法（图29-15）。图中可见在复制叉处，一个子代双螺旋成串珠状，另一为裸露状。换言之，亲代组蛋白在复制时进行保留性分离。即在复制时原有组蛋白并不与DNA脱开，而与含领先链的DNA双螺旋在一起；新合成的组蛋白则装配在含随从链的DNA双螺旋上。两个子代双螺旋之间的这一差别，可能是因为组蛋白与双链DNA的结合力比与单链的更强一些。含随从链的子代DNA在联结冈崎片段之前含单链区，所以亲代组蛋白不与之结合。

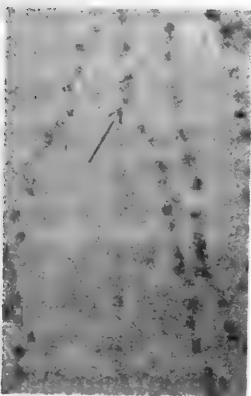


图29-15 在亚胺环己酮（蛋白质合成抑制剂）存在下，由DNA合成产生的不对称的复制叉。子代双螺旋之一是串珠状，另一裸露，这说明亲代组蛋白只与一个子代双螺旋结合。  
[引自D. Riley and H. Weintraub. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76(1979):331.]

线粒体和叶绿体含有其自身DNA

真核细胞中的遗传信息并非全由核内染色体DNA所编码。用酵母所做的实验，发现了与核无关的线粒体基因组。1949年，伊弗拉西，B. (Boris Ephrussi) 发现某些面包酵母的变种不能进行氧化磷酸化作用。这种呼吸缺失的变种依赖酵解过程缓慢地生长。它们只能形成很小的集落，故被称为小菌落。遗

传分析的结果,令人吃惊地看到小菌落变异可不依赖于胞核而进行分离,这现象只能用它们的线粒体含有自己的基因组加以解释。几年以后,发现线粒体中确实含有DNA。而且发现一个小菌落株线粒体DNA的浮力密度与野生型酵母的不同,这说明在此变种中线粒体的基因组大部分改变了。以后又发现具光合成作用的真核细胞叶绿体也同样含DNA,而且能被复制,转录和翻译。

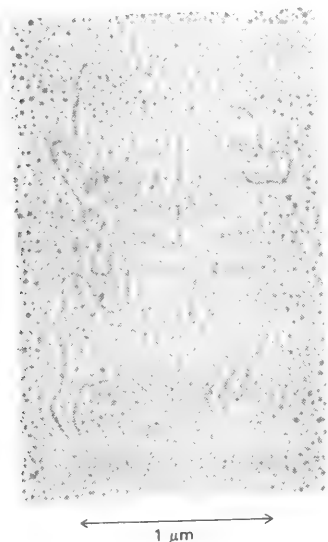


图29-16 一个含有两个首尾相接成环状基因组的线粒体DNA分子的电镜图。此分子的复制刚开始。箭头示环中相距180°的两个小环。这些置换环(D环)含新合成的DNA。环的细线示被置换的亲代DNA的单链区。[蒙Dr. David Clayton特许。]

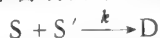
动物细胞的线粒体DNA是环形双螺旋,廓长约5 μm,相当于15kb。酵母线粒体DNA比它长五倍,叶绿体DNA典型地长10倍。线粒体及叶绿体的DNA分子缺乏组蛋白。它们相对地比较小,约与病毒基因组相仿。最清楚地得到鉴别的是酵母线粒体基因组,它为约十个蛋白质,二个核糖体RNA分子及约二十六个转移RNA编码。由线粒体DNA决定并在此亚细胞结构中合成的分子,只占线粒体总蛋白量的5%。因此,线粒体中多数蛋白质还是由核基因组编码。但是线粒体DNA的遗传作用是不可少的。例如,线粒体内膜的细胞色素氧化酶的七个亚基中的三个,ATP酶的十个亚基中的三个皆由线粒体基因组编码。基因组的分开存在造成了特殊的困难。线粒体DNA复制是怎样与染色体复制及细胞分裂相协调的?在胞液中合成的蛋白质怎样进入线粒体并与线粒体基因产物相互作用?最令人不解的是,既然线粒体中95%的蛋白质是由核基因组决定,为什么

它还要有自身的基因组?对这些迷人的问题,目前尚无解答。

## 真核DNA含有许多重复碱基序列

布里顿, R. (Roy Britten) 及其同事研究了热变性DNA重缔合的动力学,结果显示真核细胞DNA与原核DNA不同,它们含有许多重复的碱基序列。实验是用切应力使DNA变成小片段,再将溶液加热超过其解链温度( $T_m$ )而致变性。然后使这个单链DNA溶液冷却至低于 $T_m$ 约25℃的温度——这是互补链重缔合成双螺旋DNA的最适温度。重缔合的动力学可用不同方法测量。一个技术是不断测定溶液在260nm的光吸收(443页)。在此波长时,双链DNA的消光系数比单链DNA小约40%,这种降低称为减色性。另一实验方法是根据这样的事实,即双链DNA可结合于羟基磷灰石(磷酸钙盐)柱上,而单链DNA则通过此柱。此技术的诱人特点是:可以根据热变性后重缔合速率的差异,将大量DNA分部。

大肠杆菌或T4噬菌体DNA的重缔合动力学,表现出与双分子反应相同的时间效应:



式中S及S'代表互补的二个单链分子,D是重缔合的双螺旋, $k$ 是重缔合的速率常数。就这类

反应而论，单链分子的份数  $f$ ，随时间进展而减少，并有如下关系：

$$f = \frac{1}{1 + kC_0t}$$

上式中  $C_0$  是 DNA 的总浓度（以摩尔核苷酸/升表示）， $t$  是时间（秒）。对一特定 DNA 及特定实验条件（如离子强度，温度，DNA 片段的大小）而言， $f$  只与  $C_0t$ （即 DNA 浓度和时间的乘积）有关。将  $f$  对

$C_0t$  对数作图，就能简便地描述重缔合的动力学，这种  $C_0t$  图是反 S 形曲线（图 29-17）。由此图可得一有意义的指标  $C_0t_{0.5}$ ，即当半数 DNA 重缔合时（ $f = 0.5$ ）的  $C_0t$  值。大肠杆菌 DNA 的  $C_0t_{0.5}$  是约  $9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}$ ，T4 噬菌体是  $0.3 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}$ 。这些数值指出，大肠杆菌 DNA 比 T4 噬菌体 DNA 的

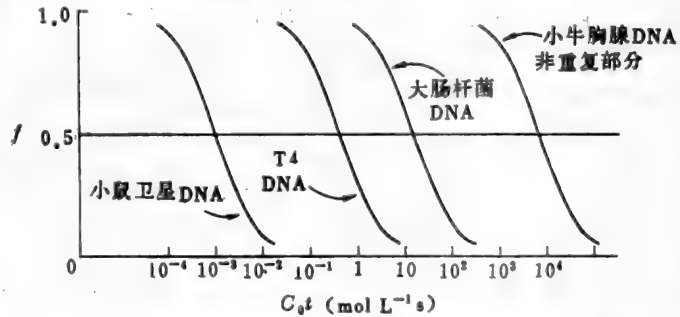


图 29-17 几种不同热变性 DNA 重缔合动力学的  $C_0t$  曲线。以单链分子的份数对  $C_0t$  作图。小鼠卫星 DNA 的迅速重缔合说明它含有大量的重复碱基序列。[依据 R. J. Britten and D. E. Kohne, *Science* 161 (1968): 530.]

重缔合要慢约 30 倍。其原因是大肠杆菌 DNA 较大，它所含切变后片段的种类比 T4 噬菌体多。因此在切变后大肠杆菌 DNA 溶液中互补片段的浓度就比相应的含核苷酸浓度相等的 T4 噬菌体片段低。以致重缔合速度也低。对各种原核细胞 DNA 分子的研究指出； $C_0t_{0.5}$  直接与基因组的大小有关。

但以此法对小鼠 DNA 进行研究，出现了未预料的结果。哺乳类的基因组约比大肠杆菌的大三个数量级，因此  $C_0t_{0.5}$  数值似可达  $10^4 \text{ mol L}^{-1} \cdot \text{s}$  如果一个  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  DNA 溶液的  $C_0t_{0.5}$  是这一数值，那就需要  $10^8 \text{ s}$ （约三年）才能完成 50% 重缔合。但令人惊异的是小鼠 DNA 中的 10% 在数秒钟内就完成了 50% 重缔合，即实际上这一部分的小鼠 DNA 的重缔合比最小的病毒 DNA 还快；这说明它含有为数众多的重复序列。分析  $C_0t$  曲线的结果，提示小鼠 DNA 的这一部分含有约 100 万拷贝、具 300 碱基对的重复序列。小鼠 DNA 中约有 20% 则以中等速率复性，其解释是此部分中的某些序列有  $10^3 - 10^4$  个拷贝。其余 70% 的小鼠 DNA 则缓慢地复性。此部分的  $C_0t_{0.5}$  数值提示它含有独特或近乎独特的碱基序列。

迄今研究过的真核细胞，除酵母外皆含重复 DNA，而原核细胞则否。例如，人的 DNA 有 30% 皆含至少重复 20 次的重复序列。在不同生物中高度重复，中等重复和单一拷贝 DNA 的比率是不同的。

### 高度重复性 DNA（卫星 DNA）集中在着丝点

许多高度重复性 DNA 皆有其各不相同的浮力密度，因此可以用密度梯度离心法将它们分离开来。例如 *vinilis* 果蝇 DNA 可显出一个主要区带及三个较轻的卫星区带（图 29-18）。这些卫星区带全由高度重复 DNA 所构成。事实上，每带含一个七核苷酸重复序列：



这些高度重复 DNA 的作用尚不清楚。但它们在染色体上的定位已用高尔, J. (Joseph Gall) 及帕杜, M. L. (Mary Lou Pardue) 建立的即地杂交技术加以证实。方法是将细胞固定于一薄层琼脂胶下, 然后以碱处理使 DNA 变性。再将此材料与  $^3\text{H}$  标记的 RNA 一起保温, 此 RNA 是以纯化的小鼠卫星 DNA 为模板在试管中制得的。放射性 RNA 与含卫星 DNA 的染色体区域形成的杂交, 可用放射自显影术检测。结果是明确的, 即小鼠卫星 DNA 集中在着丝点区。这些序列的定位及与它们互补 RNA 的缺失提示, 卫星序列是在有丝分裂和减数分裂中起一种将染色体排齐的作用。

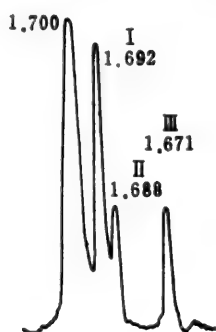


图 29-18 卫星 DNA 的沉降图显示三个明显区带 ( $\rho = 1.692$ ,  $1.688$  及  $1.671$ )。virilis 果蝇 DNA 在中性 CsCl 中离心平衡的结果。[依据] J. G. Gall, E. H. Cohen, and D. D. Atherton, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38 (1974): 417.]

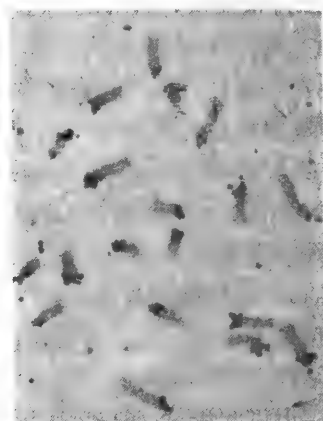


图 29-19 小鼠细胞的放射自显影图, 示卫星 DNA 的定位。[蒙 Dr. Joseph Gall 特许。]

## 核糖体 RNA 的基因有前后几百次重复

为核糖体 RNA 分子编码的基因有二个很明显的特点。一是它们前后重复。几乎所有的真核细胞皆含这种基因 100 多拷贝以上。其次, 多数 rRNA 基因集中于与核仁在一起的染色体的特定部位。缺乏核仁的变种只能合成极少 rRNA, 因此难以成活。由于伯恩斯特, M. (Max Birnstiel), 布朗, D. (Donald Brown), 米勒, O. (Oscar Miller) 及其同事们的工作, 人们对此类基因有了不少了解。已从非洲爪蟾 (*Xenopus laevis* 及 *Xenopus mulleri*) DNA 中纯化了为四种 rRNA——18S, 5.8S, 28S 及 5S rRNA——编码的基因。采用这些动物为原料的原因是它们的卵细胞含有大量的此类基因。

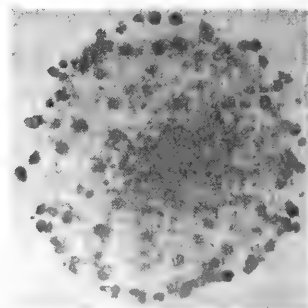


图 29-20 由爪蟾卵子分离的核的染色显微图。图示当 rRNA 基因扩增时, 数以百计的核仁生成。[引自 D. D. Brown and I. B. Dawid, Science 160 (1968): 272.]

18S, 5.8S及28S rRNA 的基因密集在一起, 且前后重复成串。即地杂交研究已阐明这些基因处于核仁处。重复单位包括一个**40S RNA**前体的基因及一个居间段 (图29-21)。40S (8kb)前体被修饰和裂解后, 成为成熟的18S, 5.8S及28S rRNA (550页)。居间段不被转录 (图29-22)。蟾蜍体细胞约含这样前后排列的重复单位500拷贝。在卵子生成过程中, 这类基因经历一个惊人的选择性扩增。它们复制几千次, 形成约  $2 \times 10^6$  拷贝。事实上, 为rRNA分子编码的基因占了卵细胞总DNA量的75%。扩增的DNA以染色体外的环状形式存在并与很多新核仁相结合。这一选择性基因扩增使卵细胞得以聚集  $10^{12}$  个核糖体, 以保证细胞分裂时蛋白质迅速合成之需。如果没有基因扩增, 则聚集  $10^{12}$  个核糖体需要几个世纪才能完成!

最小的rRNA分子即5S rRNA的基因亦是前后重复的。体细胞及卵细胞皆含此基因约24,000拷贝, 它为一含120个核苷酸的RNA分子编码。这些基因在多数蟾蜍中是密集在染色体末端部分。也有一个居间段将这个rRNA的重复基因隔开 (图29-23)。而此居间段比基因长数倍。很特别的是它还包括一个不转录的假基

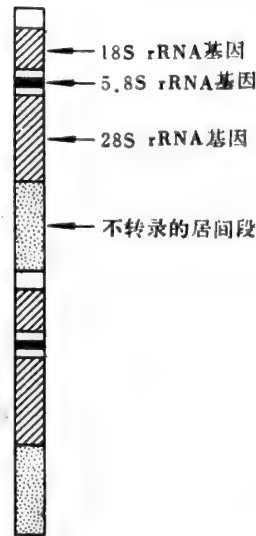


图29-21 爪蟾中18S, 5.8S及28S rRNA 的前体40S基因的结构。前后重复的基因由不转录的居间段隔开。重复单位长约13kb。

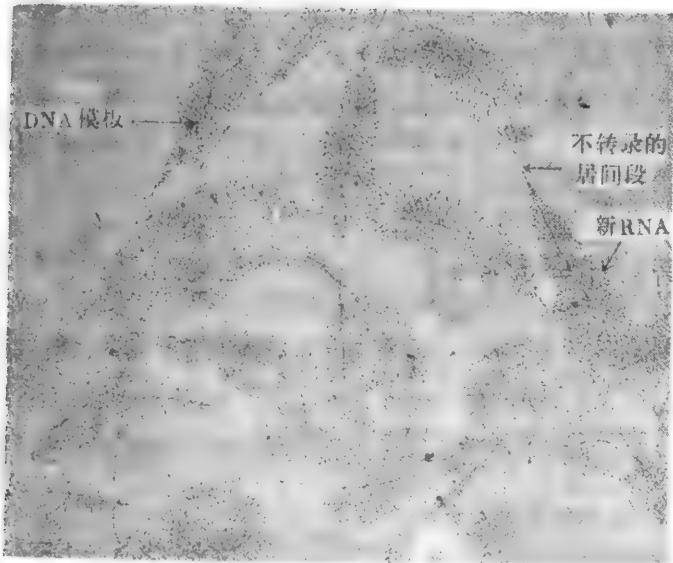


图29-22 核仁DNA的电镜图, 可见清晰的18S, 5.8S及28S rRNA 基因的前后重复排列。深色轴纤维是DNA 纤细的旁侧纤维是新合成的与蛋白质结合的RNA分子。羽状尖头为RNA分子转录的起始点 羽状间的裸区为不转录的居间段。 [引自 O. L. Miller, Jr., and B. R. Beatty. Portrait of a gene. *J. Cell Physiol.* 74(supp. 1, 1969): 225.]

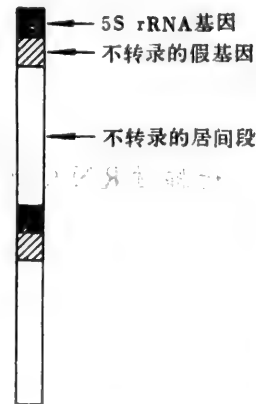


图29-23 非洲爪蟾5S rRNA 基因的结构。这些前后重复的基因亦由不转录的居间段分开。每一重复单位约含750碱基对。



因，后者的碱基顺序与基因本身非常相似。此类居间段在真核基因中的作用还是个谜。

组蛋白的基因是密集的并有前后多次重复

为蛋白质编码的基因是如何排列的？最先分离和得到鉴别的是组蛋白的一类基因，因为在迅速分裂海胆胚胎中组蛋白的mRNA十分丰富。这种水生无脊椎生物可在10小时内由一个

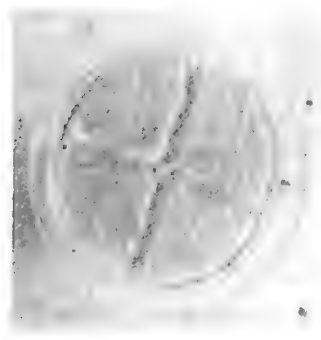


图29-24 四细胞阶段的海胆胚胎光学显微图。[蒙Dr. Annamma Spudich 特许。]

个性细胞发育成含一千个细胞的胚囊。为了装配这许多新染色质，必有大量组蛋白合成。实际也是这样，在早期胚胎发生中合成的蛋白质，四分之一以上皆为组蛋白。同时在此阶段合成的信使核酸中，70%是组蛋白mRNA，因此较易分离获得。然后可测定组蛋白mRNA与海胆DNA杂交的动力学，以计算组蛋白基因的拷贝数。结果是它们的杂交速率比单拷贝的快几百倍，这提示组蛋白基因是高度重复的。不同品系的海胆基因含拷贝数自300至1000不等。其它生物的重复频率则较低（表29-4）。一个生物体含有的组蛋白基因拷贝数似与其需要迅速合成组蛋白mRNA相关。

高度重复的组蛋白基因在基因组中又是如何排列的？

表29-4 组蛋白基因的重复频率

生物品系	拷贝数
海胆	300—1,000
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	110
爪蟾 <i>(Xenopus laevis)</i>	20—50
小鼠	10—20
小鸡	10
人	30—40

这些基因比大多数海胆DNA含GC量高（55%，一般为42%），所以有较高的浮力密度。利用这一事实可将富有组蛋白基因的DNA段制备出来。将此相对纯化的DNA用限制性内切酶切断后，可得到能与组蛋白的各种mRNA杂交的一些7 kb片段。将这些片段在大肠杆菌中克隆出来，然后用限制性内切酶消化，进行分析及电镜观察。研究结果揭示：为五种主要组蛋白编码的基因密集在一个基本的7 kb重复单位上（图29-25）。这种重复单位的五个编码区由五个居间区间隔开。编码区内则无间断，这与以前所描述的其它真核基因有所不同（494页）。这五个组蛋白基因的密集区，前后重复多次。多次重复的基本情况相似，但不全同，这一点与H1，H2A及H2B是互相密切有关而非各为独特蛋白质的这一认识相符合。在不同组织中和在发育的不同阶段中，组蛋白基因以不同的组合被表达。

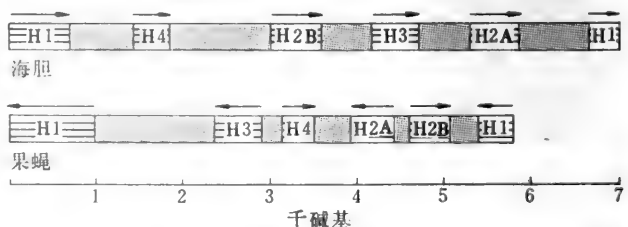


图29 25 海胆和果蝇的组蛋白密集基因图。编码区标以组蛋白种类，居间段空出，箭头指转录方向。

基因的这种排列有什么功能上的意义？这种重复无疑对快速合成大量组蛋白mRNA有重要意义。但重复的连续性的原因就不清楚了。也许，这五类组



蛋白的基因密集使它们的合成得到协调,从而使H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub>及H<sub>4</sub>以等摩尔量,而H<sub>1</sub>以半摩尔的相对量来完成合成。

## 许多主要蛋白质由单拷贝基因编码

已知许多rRNA以及组蛋白的基因皆是多次重复的。是否为大量产物编码的其它基因也为多拷贝? 布朗, D. (Donald Brown) 对此问题进行了研究,他从家蚕(*Bombyx mori*)中分离出为丝心蛋白编码的基因。他选用这个系统的原因是丝心蛋白的mRNA具有化学上的特点。它是富含甘氨酸的重复氨基酸顺序的模板。而且,在幼虫发育的某一特定阶段,大量的丝心蛋白能由一种单一巨型细胞合成。丝心蛋白的mRNA分子很大(9.1kb),并且比rRNA及其它RNA分子富含G,所以易于纯化。亦可以利用它的不寻常的高浮力密度加以纯化。将纯的丝心蛋白mRNA与DNA进行杂交的结果指出:每个单倍体基因组中只含一个丝心蛋白基因。

这一结果对于真核细胞中的基因表达和分化,都有重要联系。它说明,即使基因仅是一个拷贝,仍可大量合成其相应蛋白质。丝心蛋白的单个基因是合成 $10^4$  mRNA分子的模板,这些分子在数天之内是稳定的。每个mRNA是合成 $10^5$ 蛋白质的模板。那么一个单个基因,在四天之内足以合成 $10^9$ 蛋白质分子。因此,重复的rRNA基因及重复的组蛋白基因并不是一般规律,而实是一种例外。在家蚕工作中看到的丝心蛋白的单一基因,对为蛋白质(无论产量多少)编码的基因来说是更加典型的。例如,网织红细胞中只含一个或几个为血红蛋白亚基编码的基因拷贝(555页)。同样,鸡蛋白中的主要蛋白质——卵白蛋白(其量是很大的)是由母鸡的输卵管所合成,它的每个单倍体基因组中只含这基因的一个拷贝。但也不能忘记,通过选择性基因扩增来加强某一特殊细胞合成某一特定蛋白质的可能性。某些培养的肿瘤细胞,通过合成比敏感细胞多200倍的二氢叶酸还原酶,变为抗叶酸同系物细胞。这一酶量的增高就是由于二氢叶酸还原酶的基因的选择性扩增所致。可见真核基因组是一高度灵活的系统。



图29-26 家蚕 [蒙Dr. Karen Sprague特许]

## 多数单拷贝基因由重复性顺序隔开

在各种真核细胞的DNA中,约70%皆由独特的顺序构成。与重复性顺序对比,此类单拷贝基因的排列如何? 用各种不同实验分析真核染色体的结果指出:单拷贝序列之间常由中度重复性的顺序加以间隔,后者一般长为300碱基对。约有几千种不同的中度重复性顺序存在。它们在基因组中可重现数百次,占全部DNA的20%。但DNA的这种散置的中度重复顺序的功能未详。可能它们是与特异的调节大分子的结合点,使调节大分子能控制相邻的单拷贝结构基因的转录。

## 高等真核生物中为蛋白质编码的基因几乎全是分隔的

真核生物中出现的重复顺序以及在其间散置着单拷贝基因的情况,在原核生物中不存在。

基因组结构上存在的另一显著差别是:在高等真核生物中,几乎所有编码蛋白质的基因中皆有间隔顺序存在。如前所述(495页),这些间隔顺序(内含子)与编码顺序(外显子)一起被转录,然后在形成成熟mRNA时去除。迄今已知的分隔基因中的内含子数由二至十七不等(表29-5及图29-27)。有些内含子相当长。例如,小鼠 $\beta$ -珠蛋白基因含一比外显子还长的约550碱基对的内含子。免疫球蛋白基因中的两节则由更长的一个

1,250碱基对的内含子所间隔。在有些基因中,内含子的总长度超过了外显子的总长度。如卵白蛋白基因含约7,700碱基对,而它的mRNA只有1,859碱基对长。一般而论,分隔基因的

表29-5 分隔的真核基因

基 因	内含子数
卵白蛋白	7
卵类粘蛋白	6
伴清蛋白	17
$\alpha$ -珠蛋白	2
$\beta$ -珠蛋白	2
$\delta$ -珠蛋白	2
免疫球蛋白L链	2
免疫球蛋白H链	4



图29-27 伴清蛋白基因图。空白示间隔顺序(内含子),它可被转录,但在成熟mRNA中不存在。

间隔顺序长于其表达序列。有趣的是,在进化过程中内含子的碱基顺序比外显子改变得更迅速。小鼠及兔的 $\beta$ -珠蛋白基因中的最小的内含子具有相当不同的碱基顺序。但它们的长度及在基因中的位置都相似。最突出的是内含子和外显子的交界段即拼接部位是保守的。

有些RNA的基因也是分隔的,如酵母的一个tRNA基因,在与编码成熟tRNA反密码子环区段邻接处,有一含14碱基对的内含子。一个为tRNA编码的线粒体基因也是分隔的。但多数tRNA及rRNA的基因是连续的。此外,海胆及果蝇的组蛋白基因似不含间隔顺序。迄今已知的编码蛋白质的分隔基因主要来自鸟及哺乳类。低等真核生物是否亦有许多分隔基因,将是有趣的研究。

分隔基因的发现出乎意外,但由此提出了许多诱人的问题。分隔基因的存在是否反映了在进化过程中新蛋白质由旧蛋白质的片段形成?间隔顺序是否参与基因表达的调控?人们清楚地看到极有意义的新领域已经展现。关于分隔基因的一个重要方面——由初级RNA转录本上切去间隔顺序的知识正在迅速地累积,将在下面讨论。

## 真核细胞中的RNA由三类RNA聚合酶合成

现在谈转录。真核细胞中的RNA由三类不同RNA聚合酶合成,这三类酶在模板特异性,定位及对抑制剂的敏感性方面皆不同。I型聚合酶在核仁中存在,并在此将前后相连的18S,5.8S及28S rRNA基因转录。另外的RNA分子,如5S rRNA及所有的tRNA则是由另一存在于核质而非核仁中的III型聚合酶所合成。分子很大的、作为信使RNA的前体RNA,则是由也存在于核质中的II型聚合酶所合成。与此相反,原核细胞中所有的RNA都是由单独一种RNA聚合酶所合成。真核细胞各种RNA聚合酶的一个共同特点是它们皆由二个大亚



证据来自对发育中昆虫染色体的研究。果蝇唾液腺的巨大多线染色体含有一千多个未分离的、按序排列的 DNA 分子。每一多线染色体具有特性的、在光学显微镜下可见的一系列区带——称染色粒。在从幼虫发育到蛹的过程中，某些色粒出现暂时性的膨大（蓬松），因为在此区带的DNA由密集状转变为分散状（图29-29）。这些蓬松相当于活化的转录区。令人惊异的是可以用蜕化素（一种昆虫甾体激素）在体外对分离得到的唾液腺加以诱导形成蓬松。某些特异的粒带会按一定的时相膨胀，然后再回缩，同时其合成的mRNA群体也跟着发生改变。

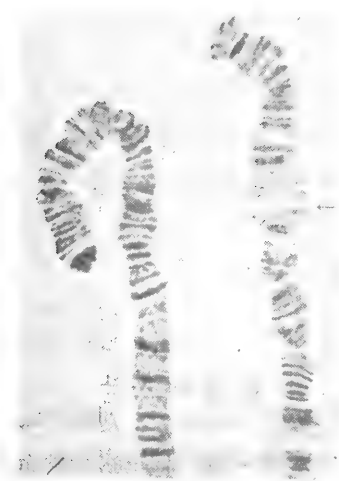


图29-29 发育期间多线染色体中蓬松的生成 箭头指出果蝇染色体中一个明显的蓬松 [蒙Dr. Joseph Gall 特许。]

### 单一初级转录本加工后形成三种核糖体 RNA

由三种RNA聚合酶所合成的RNA分子称为初级转录本。这些新生RNA在它们进入胞液成为成熟的rRNA，tRNA和mRNA分子之前，在核内要经受广泛的修饰。研究得最透彻的是由初级转录本形成rRNA，它也是目前了解最清楚的加工过程。如前所述，18S，5.8S及28S rRNA的基因形成一密集单位，并前后重复多次。事实上，核仁中的RNA聚合酶I将此密集区的三个基因转录，先形成一个45S RNA（图29-30）。这个13kb的前体经酶作用

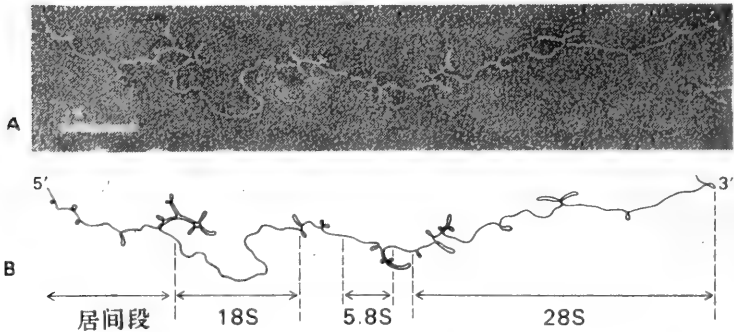


图29-30 HeLa细胞的rRNA的45S前体。展开的前体在电镜下呈现明显的发夹环形结构。由此前体可排出28S和18S RNA分子的直线排列。A是45S前体的电镜图（横线等于2000 Å）。B是A中分子的描线图。[引自P. K. Wellauer and I. B. Dawid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (1973): 2828.]

被修饰并断裂为成熟的18S，5.8S，及28S rRNA（图29-31）。约一百个核苷酸被甲基化（几乎皆在其核糖单位的2'羟基部位）。真核生物rRNA的甲基化的部位是高度特异的，并且表现出保守性，因为在进化中相距甚远的酵母及果蝇中 đều无差别。此外，在前体RNA中一百多

个尿苷异构成假尿苷。在成熟过程中，许多核糖体蛋白质与这些RNA及其前体形成密切的结合。很可能RNA与核糖体蛋白质之间的相互作用，是使某些位点能被核酸酶切开的原因。

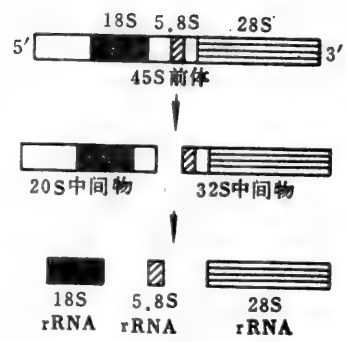


图29-31 自初级转录本形成哺乳类rRNA  
 区间段以空白表示。

### 信使RNA由巨大的核RNA前体 (hnRNA) 选择性地产生

真核细胞中rRNA的生成与原核细胞相似 (477 页)。但真核 mRNA 与原核 mRNA 之间存在着重要的差异:

1. 真核细胞中的初级转录本并不直接用作 mRNA; 在由胞核转运到胞液之前它们要经广泛的加工处理。在真核细胞中翻译与转录在时间上及空间上是分开的，而在原核细胞中它们则是密切关联的。
2. 真核细胞的初级转录本约长 2 至 20kb，因此被称作不均一核 RNA (hnRNA)。这些初级转录本的长度比由其衍生出来的 mRNA 长出数倍之多。在生成真核 mRNA 时，进行了广泛的拼剪和链断裂。hnRNA 除了作为 mRNA 前体外，还有哪些功能尚属未知。
3. 真核 mRNA 在其 5' 端含有修饰核苷酸组成的帽。其中不少尚在 3' 端具有长的多聚 A 尾。
4. 真核 mRNA 是单顺反子，即它们是合成单一多肽链的模板。相反，许多原核 mRNA 则是多顺反子 (例如，*lac* mRNA 是三个多肽链的模板)。
5. 真核细胞中的 mRNA 分子群体不仅依赖于某些特定基因的转录速率，并且真核细胞还具有另一水平的控制因素即：决定一初级转录本究竟将被降解去除，抑或被加工为成熟 mRNA 并转运至胞液的因素。

### 真核 mRNA 带有 5' 端帽，并常具 3' 多聚 A 尾

所有已知真核 mRNA，其 5' 端皆经特定修饰，而 tRNA 及 rRNA 则否。7-甲鸟苷通过不寻常的 5'-5' 焦磷酸键，连接于 mRNA 上 (图 29-32)。这种称为帽的特殊结构是在初级转录本上形成的。新生 mRNA 链的 5' 三磷酸末端先被水解成二磷酸，然后由 GTP 转来一个鸟苷酸单位。末端鸟苷的 N-7 氮又被 S-腺苷甲硫氨酸甲基化后，形成帽 0。邻近的核糖也可被甲基化后形成帽 1 及帽 2 (图 29-32)。此类帽能保护 5' 端使不受磷酸酶及核酸酶水解，由而增加了 mRNA 的稳定性。此外，帽还能通过真核的蛋白合成系统增进 mRNA 的翻译。

多数真核 mRNA 在 3' 端有一多聚 A 尾。一种多聚 A 聚合酶作用于初级转录本 (其 3' 末端是 GC，并在约 20 个残基之前有一个 A A U A A 顺序)，使 3' 端加上 150—200 个腺苷酸。将

mRNA注入蟾蜍卵中进行研究，发现多聚A尾能提高 mRNA 的稳定性，但对其翻译似无作用。组蛋白mRNA无多聚A尾，由此亦可知尾与mRNA的由胞核至胞液的转移无关。

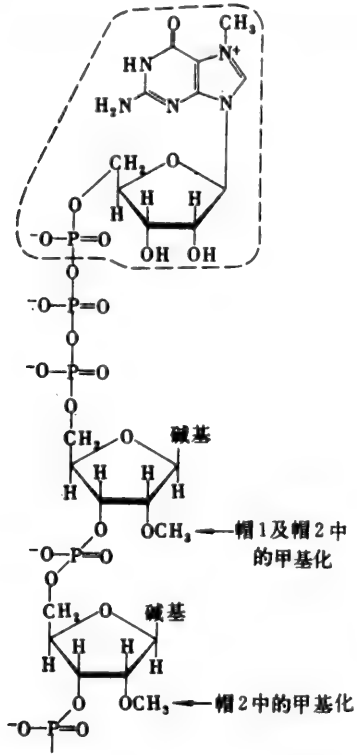


图29-32 真核mRNA的5'端帽结构。所有帽结构皆含7-甲基鸟苷酸(框示)。通过焦磷酸键连于5'端。在帽0中，核糖无甲基化。帽1中一个甲基化，帽2中两个甲基化。

拼接酶高度准确地从分隔基因的  
初级转录本中除去内含子

在拼接RNA时，有两个磷酸二酯键被破坏，同时形成一个新磷酸二酯键。核酸内切酶和连接酶活性可能处于同一酶复合体上，而拼接反应也许亦是受协调的。当前正在制取拼接酶。很明显，它们的作用必须极为准确。在拼接中如在切点发生一个核苷酸的错移，就会从切点的3'末端使读码变动，这就将形成全然不同的氨基酸序列。那么拼接酶怎样识别它们的目标？现已知蛋白质的RNA转录本中一些内含子与外显子交界处的碱基顺序(表29-7)。这些交界处的结构有一个共同的模式即：内含子的碱基顺序以GU开始，以AG终止。值得注意的是在小鸡、兔、小鼠和感染人及猴细胞的SV40病毒中都可找到同样的拼接信号。

在转移RNA分子的拼接点周围的顺序却大不相同，这指出大概至少有两个拼接酶，一个产生mRNA，另一个生成tRNA。tRNA的拼接反应在进化相距较远的品种中似乎很类似。人们将酵母tRNA的克隆基因注入蟾蜍卵内，用此实验来研究单细胞真核生物的基因是否能在两栖类中转录及加工。

结果颇令人惊异：虽然此二品种的tRNA基因相差很多，但酵母基因却能在蟾蜍中得到转录并正确加工。尤其是一个14核苷酸的间隔顺序能正确地拼接去掉(图29-33)。因此说，拼接酶的特异性在漫长的进化过程中被保留下来。

表29-7 有内含子的转录本中拼接点的碱基顺序

基因区	外显子	内含子	外显子
卵白蛋白内含子2	UAAGGUGA	~~~~~	ACAGGUUG
卵白蛋白内含子3	UCAGGUAC	~~~~~	UCAGUCUG
$\beta$ -珠蛋白内含子1	GCAGGUUG	~~~~~	UCAGGCUG
$\beta$ -珠蛋白内含子2	CAGGGUGA	~~~~~	ACAGUCUC
免疫球蛋白 $\lambda_1$ 内含子1	UCAGGUCA	~~~~~	GCAGGGGC
SV40病毒早T-抗原	UAAGGUAA	~~~~~	UAGAUUC





含有与18S rRNA 3'端片段互补的顺序。我们还记得在原核细胞中mRNA的始动子顺序也与16S rRNA的3'末端区配对(513页)。至于mRNA 3'端很长的不翻译区的功能,则尚属未知。这个637个核苷酸区的特征是它含有许多短重复顺序。卵白蛋白的mRNA以及其它已知顺序的mRNA的多聚A尾之前总有GC领先,而在前约20个碱基处总有AAUAAA领先。

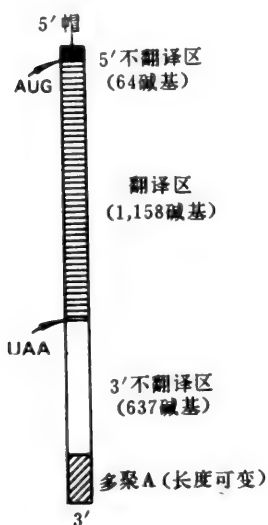


图29-34 小鸡卵白蛋白mRNA结构示意图。

真核细胞核糖体(80S)由一个小亚基(40S)及一个大亚基(60S)组成。真核细胞的蛋白质合成机器与原核细胞类似,只是组成的蛋白质及RNA不相同,且种类较多。真核细胞胞液中的核糖体比细菌中的略大些,它们的沉降系数是80S而非70S(图29-35)。它们和细菌核糖体一样,能解成一个亚基(60S)及一个小亚基(40S)。40S亚基含有一个18S RNA分子和大约30个蛋白质。其它三种rRNA——5S, 5.8S及28S——则位于60S亚基中,后者还含有约45个蛋白质。

翻译过程的起始、延长及终止阶段,一般在真核和原核生物中相似。然而,在一些反应机制上有些细节的差别。例如,真核细胞利用一个特异tRNA来起始反应(称tRNA<sub>Met</sub>),

而它并非甲酰化的。真核及原核细胞在对翻译过程抑制剂的敏感性上,亦有不同。亚胺环己酮只抑制真核细胞的延长过程,而红霉素只阻挠原核细胞的延长作用。有趣的是,线粒体及叶

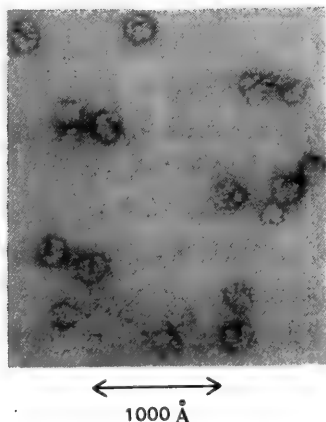


图29-35 真核细胞80S核糖体电镜图 [承D r. Miloslav Boublik特许。]

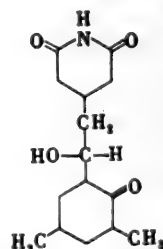


图29-36 亚胺环己酮的结构。它是真核细胞中蛋白质合成的延长步骤的抑制剂,对原核细胞无作用。

绿体中的核糖体与细菌核糖体比与其胞液中的其它核糖体更为相似。此外,线粒体及叶绿体的始动RNA都是甲酰化的,并且它们对能选择性阻挠原核细胞翻译的多数抑制剂,也都敏感。

## 地中海贫血是血红蛋白合成的遗传性缺陷

对血红蛋白的研究,为了解蛋白质结构和功能做出了大量贡献(第4, 5章)。同样,研



究血红蛋白的基因及其表达方式，也提供了真核基因功能概况的内情。在发育过程中，胚胎血红蛋白先被胎儿血红蛋白(Hb F,  $\alpha_2\gamma_2$ )，再被成人血红蛋白(Hb A,  $\alpha_2\beta_2$ )所置换。成人亦合成少量Hb A<sub>2</sub>，其亚基构成是 $\alpha_2\delta_2$ 。我们记得Hb F比Hb A有更高的氧亲和力，因为它与二磷酸甘油酸的结合较不紧密(55页)。Hb F对氧的高亲和力使氧气得由母体更好地转给胚胎循环。Hb F实际上是二种物质的混合物，一个具有丙氨酸，另一个在 $\gamma$ 链的第136位具有甘氨酸，因此这些亚基分别被称为 $G\gamma$ 和 $A\gamma$ 。

所有的血红蛋白基因谱图皆已清楚。每一单倍体基因组皆含二个密切连锁的 $\alpha$ 基因。除了在一些稀有的变种中外，这些基因似为等同的。另外的珠蛋白基因则以 $G\gamma-A\gamma-\delta-\beta$ 次序密集在另一染色体上(图29-37)，这些在功能上相关的基因为什么在染色体上排列靠近？是一有兴趣的课题。一个可能性是发育过程中 $\gamma$ 基因要转换成 $\delta$ 及 $\beta$ 基因，因而就有必要相互接近。这些基因的连锁也反映了它们的进化历史。 $\gamma$ 、 $\delta$ 及 $\beta$ 基因可能有一个共同的基因祖先，后者先是前后重复，然后进一步分化。



图29-37 人 $\gamma$ 、 $\delta$ 及 $\beta$ -珠蛋白基因谱图。

地中海贫血症是一组遗传性贫血症，其病因是血红蛋白中的一个链的合成速率有所降低。此病的英文名 thalassemia, 来自希腊文“海”，并由于病人多为地中海人后裔。如遗传上为纯合子，称为显性地中海贫血，如为杂合子，则称隐性地中海贫血。名前置的 $\alpha$ 或 $\beta$ 是指合成速度有缺陷的链。经珠蛋白 mRNA 及珠蛋白 DNA 克隆的研究，使人们对此疾病有所了解。某些地中海贫血的分子缺陷得到了澄清：

1. **基因缺失** 在一些 $\alpha$ -地中海贫血症中，一个或二个 $\alpha$ -珠蛋白基因缺失。
2. **mRNA不稳定** 在血红蛋白 Constant Spring中，由于一个密码子的突变[由UAA(终止信号)成为CAA(谷酰胺)]，使 $\alpha$ -链由141个残基变成172个。由于原来的非编码区的一部分亦被翻译出来，故使改变了的mRNA易受核酸酶作用。
3. **链起始上的缺陷** 在一些 $\beta$ -地中海贫血症中，翻译的起始异常之慢，可能在5'端非编码区有缺损。
4. **过早的链终止** 有一种 $\beta$ -地中海贫血症是由于一个单碱基改变，因而使第17残基处的AAG(赖氨酸)变成了UAG(终止信号)。
5. **mRNA产生不足** 在多种 $\beta$ -地中海贫血症中， $\beta$ -珠蛋白基因是存在的，但是只产生很少的 $\beta$ -珠蛋白mRNA。正在努力地探讨其原因，在某些地中海贫血症中，间隔顺序未能正确地剪切去除是一个诱人的可能性。

## 翻译过程由一个使起始因子失活的 蛋白激酶级联反应所调控

网织细胞提取液能迅速地合成血红蛋白亚基，直至血红素供应不足。无血红素存在时，蛋白质合成中止，因为此时突然生成一种蛋白质合成的酶抑制剂。此抑制剂事实上即是蛋白激酶。此激酶的作用目标是eIF-2，这是一个能与GTP结合并将met-tRNA<sub>i</sub>输送到40S核糖

体亚基上去的起始因子。eIF-2被磷酸化后即失活，可使蛋白质合成的始动停顿。血红素又如何调节这种激酶的活性？这一作用又是由另一激酶介导(图29-38)。修饰起始因子的 eIF-2

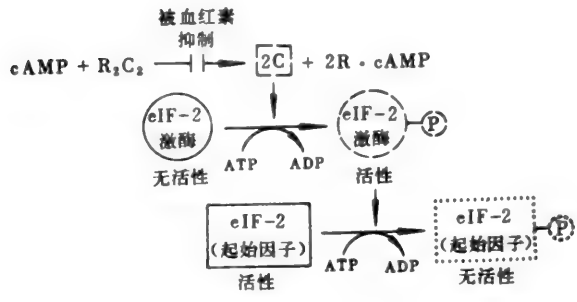


图29 38 磷酸化级联反应导致起始因子eIF 2失活

蛋白质合成。此处的蛋白激酶级联反应与糖原代谢的调控类似（283页）。另一相似点是这些激酶的控制效应可被特异的磷酸酶逆转。

### 白喉毒素抑制移位作用，从而阻断真核细胞的蛋白质合成

在有效的免疫接种施行之前，白喉是儿童死亡的主要原因。这疾病的致死作用主要来自感染上呼吸道的白喉杆菌所分泌的一种毒素。该毒素的结构基因存在于一种溶原噬菌体中，后者生长在某些品系的白喉杆菌中。几微克的这种61 kdal 毒素就能使未经免疫的人致死，因为它抑制蛋白质合成。更准确地说，白喉毒素能使对移位必要的延长因子失活，由而在真核细胞中阻断了蛋白质合成的延长过程。在真核细胞中此因子称为延长因子2（EF-2），或称移位酶，它与细菌中的EF-G作用相似。在肽键形成后，移位酶对GTP驱动的肽酰tRNA由A位转到P位并对联系发生的mRNA的移动，都是必要的。白喉毒素使移位酶失活的机制特别有趣。这种毒素催化移位酶进行共价修饰。NAD<sup>+</sup>将其腺苷二磷酸核糖（ADPR）部分转给移位酶，释出尼克酰胺。

白喉毒素是一两性分子，可被裂解为二个区段。一个21 kdal A 片段，一个40 kdal B 片段。B 区可与敏感细胞表面结合，而A 区起催化移位酶进行ADP-核糖化作用。更确切地说，B 区与质膜上的神经节苷脂G<sub>M1</sub>结合，由而使催化区进入细胞。事实上，结合的毒素被分裂，故B 段留在细胞表面而亲水性的A 段就被输入胞液。有趣的是，不少其它毒素，诸如霍乱毒素（658页），也由细胞表面结合区和使重要细胞成分失活的催化区组成。



### 结合在内质网上的核糖体合成分泌性蛋白质及膜蛋白质

在真核细胞中，有些核糖体游离在胞液中，有些则是结合于称为内质网（ER）的泛存的膜系统上。结合着核糖体的内质网区称为粗糙内质网，因为它呈凹凸不平状（图29-39）；

无核糖体区则称平滑内质网。分泌大量蛋白质的细胞，如胰腺泡细胞，它的粗糙内质网高度发达。实际上，所有已知的分泌性蛋白质皆由结合在 ER 上的核糖体合成。结合在此膜系统上的核糖体也合成许多质膜蛋白质及细胞器如溶酶体的蛋白质。

冬眠蜥蜴卵中的膜结合核糖体形成结晶片（图29-40）。现在正用三维图象重建技术来分析这种有序排列。从低分辨图谱上可以看到核糖体的大亚基（60S）及小亚基（40S）都紧密处于膜表面上。大亚基有一个突起伸入膜内（图29-41）。粗糙内质网（而不是平滑内质网）含有两个跨膜蛋白质，称核糖膜蛋白（ribophorins），它们与核糖体大亚基起特异的相互作用。

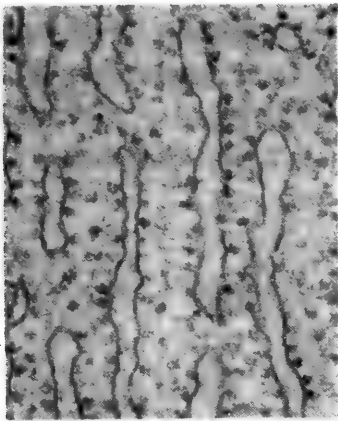


图29-39 粗糙内质网电镜图。[蒙Dr. George Palade 特许。]

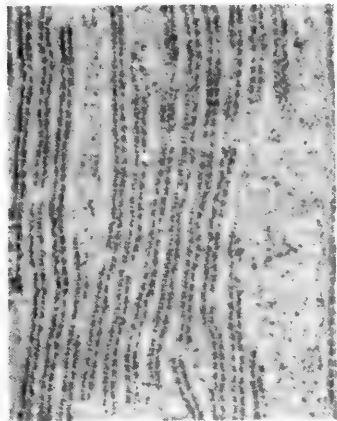


图29-40 冬眠蜥蜴卵中结合在膜上的核糖体结晶片的电镜图。[蒙 Dr. Nigel Unwin 特许。]

关于粗糙内质网上核糖体的蛋白质合成及蛋白质的去路，存在三个基本问题：

1. 是否有二种核糖体存在——一种游离在胞液中，一种与膜结合着？或者是否所有的核糖体实质上皆一样？如果仅有一种核糖体，那么一特定核糖体的游离或结合由什么因素决定？
2. 由膜结合核糖体产生的新生多肽链怎样跨越粗糙内质网的通透屏障？例如，胰脏的酶原之类（118 页）的分泌性蛋白质，它们合成后是处在内质网腔之内的。
3. 由膜结合核糖体合成的蛋白质的去向由什么决定？有些蛋白质是向外输送的，有些则导向胞内某个细胞器。粗糙内质网合成的蛋白质也成为质膜和胞内膜系统的膜本体蛋白。

### 信号序列促使分泌性蛋白质跨过内质网膜

用无细胞系统研究核糖体的蛋白质合成活性，使其第一个问题得到解答。先由胞液中分离游离核糖体，再将其加入到已剔除其核糖体的粗糙内质网膜中去。这个重构的系统在供以适当 mRNA 及其它可溶性因子时能活跃地进行分泌性

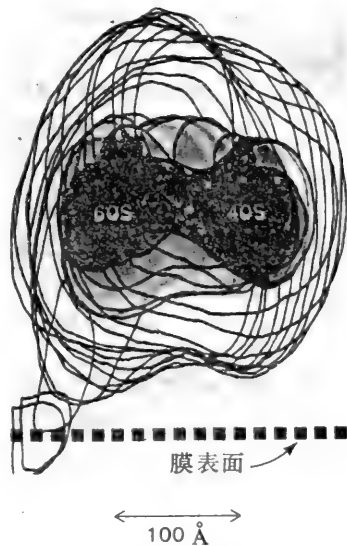


图29-41 膜结合核糖体的低分辨图象。根据核糖体在不同倾斜角所做有序排列的一系列电子显微图相重建。[依据 Dr. Nigel Unwin 的赠图。]

蛋白质合成。同样，由粗糙内质网上获得的核糖体能完善地合成正常地释入胞液中去的蛋白质。而且，在游离核糖体和取自粗糙内质网的核糖体间，也找不到结构上的差别。因此，膜结合核糖体和游离核糖体本质上是一样的。核糖体究竟是游离还是结合于内质网上只决定于它制造的蛋白质种类。

那么，新生蛋白质究竟有什么记号足以决定有关核糖体是游离或结合？1970年，萨巴蒂尼，D. (David Sabatini) 和布洛贝尔，G. (Günter Blobel) 提出假说，认为新生多肽链近游离氨基端的一段氨基酸序列是指使附着的信号。这一信号假说（图29-42）很快就被米尔斯坦，C. (Cesar Milstein) 和布朗利，G. (George Brownlee) 的工作所支持。他们发现：在体外由游离核糖体合成的一个免疫球蛋白链含有一个20氨基酸残基的氨基末端序列，而此序列在体内合成的成熟蛋白质中是不存在的。布洛贝尔研究了胰脏的蛋白质合成，发现游离核糖体进行体外合成时，主要的分泌性蛋白质皆在其氨基端含有一个长约20残基的延伸序列。现在不少分泌性蛋白质的信号序列已经搞清。它们长度约在15至30残基间，并富含非极性氨基酸残基（图29-43）。

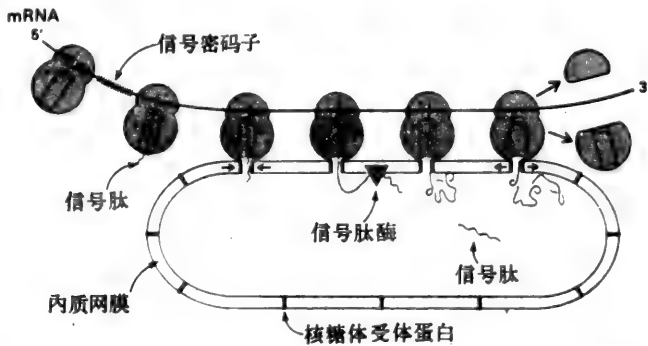


图29-42 分泌性蛋白质及膜蛋白质生物合成的信号假说。在此模式图中，新生多肽链的氨基末端序列（以无扶线表示）使核糖体附着在内质网膜上。此信号序列然后被内质网腔面上的肽酶所切断。[依据G. Blobel, In *International Cell Biology*, B. R. Brinkley and K. R. Porter, eds. (Rockefeller University Press, 1977), p. 318.]



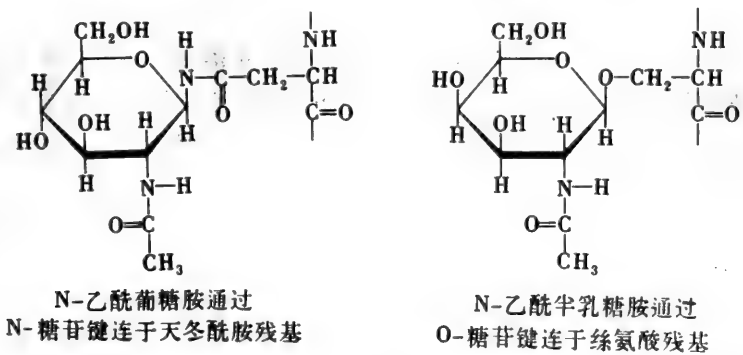
图29-43 两种分泌性蛋白质的信号序列。疏水残基框示，裂解位点以细纹线示出。

疏水性的信号序列也许具有能被内质网膜中的通道蛋白质识别的构象。很可能此新生多肽链，在其合成过程中，被主动插进内质网膜上的隧道。以后就被内质网膜腔面的肽酶所裂解（见图29-42）。注定要成为膜本体蛋白质的新生多肽链则可能含有特异的顺序，它在羧基端到达之前，就阻止多肽链转移跨过内质网膜。与之相反，分泌性蛋白质合成时，整个多肽链被输送跨过内质网膜。

信号序列机制的一个关键特点是多肽跨过内质网膜是与翻译偶联的。但也有些蛋白质是在合成完成后才跨膜的。例如，多数线粒体及叶绿体蛋白质是由核内基因编码并由游离核糖体合成。这些蛋白质先被释入胞液，然后跨过细胞器膜。因此很明显，它们的输送是在翻译后而非与翻译同时。有意思的是，这些线粒体及叶绿体蛋白质，和分泌性蛋白质一样，也含有当它们由膜内释出后即被去除的N-末端顺序。

糖蛋白由内质网中存在的多萜醇供体获得核心糖

由结合于内质网核糖体所合成的蛋白质，几乎都获得共价连接的糖单位。相反，由胞液中游离核糖体合成的可溶性蛋白质几乎都不含糖。前已述及，糖单位可使糖蛋白在膜上定向（171页），它们还可能参与决定糖蛋白的去向。一个典型的糖蛋白含有一个或数个以N-糖苷键结合于天冬酰胺侧链的寡糖单位。也有少数糖基通过O-糖苷键结合于丝氨酸或苏氨酸侧



链。与天冬酰胺残基直接结合的糖基总是N-乙酰葡萄糖胺，而N-乙酰半乳糖胺则是与丝氨酸或苏氨酸残基结合的糖。

在糖蛋白中存在的寡糖有多种（图29-44）。但在多样化中仍存在一个统一的型式，即与

天冬酰胺残基结合（N-连接）的糖单位具有一共同的内核结构。这个统一模式表达了糖蛋白中寡糖单位生物合成的方式，这就是：这一共同的寡糖结构（图29-45）从一个活化的脂类载体上被转移到处于内质网膜腔面的、正在延长的多肽链上去。

载体是多萜醇磷酸，它是一个含有约二十个异戊烯（C<sub>5</sub>）单位的长链脂类。这种强疏水性载体的末端磷酸基是连接活化

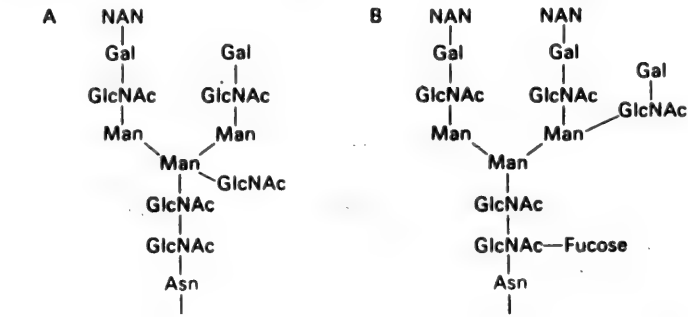


图29-44 与天冬酰胺连接的寡糖单位的结构：A. 人免疫球蛋白，B. 猪甲状腺球蛋白。

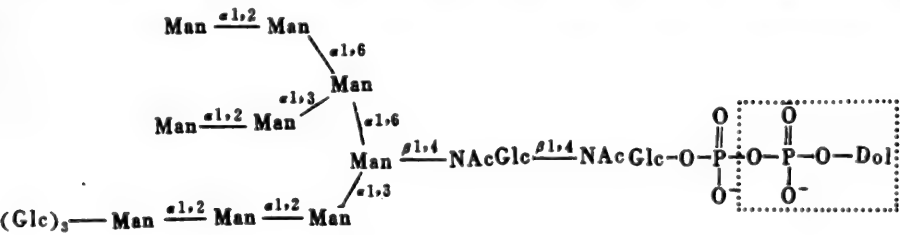
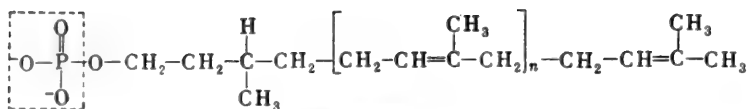


图29-45 活化核心寡糖的结构。载体（框示）是多萜醇磷酸。



多萼醇磷酸  
( $n=15-19$ )

寡糖的位点。多萼醇磷酸通过依次加上单糖获得一个包括二个N-乙酰葡萄糖胺，九个甘露糖和三个葡萄糖的寡糖单位(图29-46)。以上反应中活化糖供体是UDP和GDP的衍生物，以及多萼醇。活化的核心寡糖链在一系列特异性转移酶作用下形成，然后整块地转移到正在延长的多肽链上的某一特定天冬酰胺残基上。

糖的缩写——	
Fuc	岩藻糖
Gal	半乳糖
Glc	葡萄糖
GlcNAc	N-乙酰葡萄糖胺
Man	甘露糖
NAN	N-乙酰神经氨酸(唾液酸)

活化的寡糖链以及特异的转移酶皆处于内质网的腔面，因此胞液中的蛋白质未被糖基化。只有下列顺序Asn-X-Ser或Asn-X-Thr中的天冬酰胺残基才能接受寡糖链。结合上去的寡糖链含三个葡萄糖，但其中两个当糖蛋白仍在内质网上时就很快从多数糖蛋白上被削除。

寡糖转移给蛋白质后，释出的多萼醇焦磷酸通过磷酸酶的作用，再循环恢复为多萼醇磷酸。此一转换被一种抗菌素——杆菌肽(*bacitracin*)所阻止(606页)。另一个有趣的抗菌素类抑制剂——被囊霉素(*tunicamycin*)，是UDP-N-乙酰葡萄糖胺的疏水性同系物。它阻止核心寡糖形成的第一步——N-乙酰葡萄糖胺与多萼醇磷酸的结合。

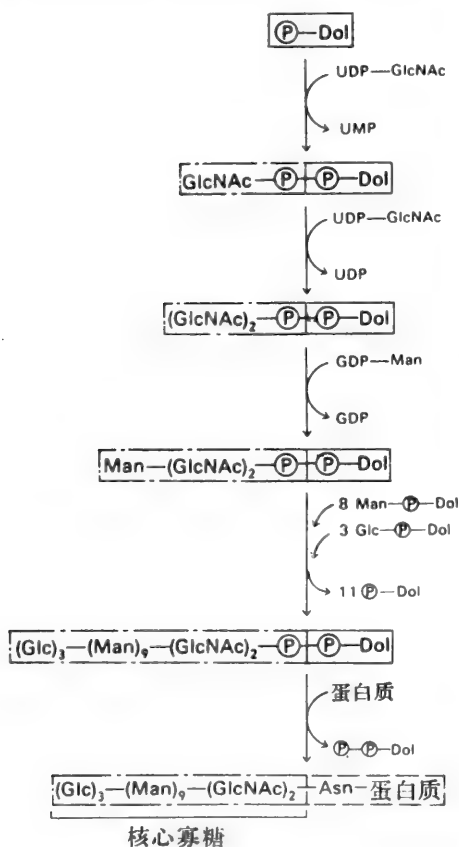


图29-46 通过依次加入单糖单位形成活化的核心寡糖。整块寡糖然后被转移到内质网腔的新生蛋白质的天冬酰胺侧链上。

## 糖蛋白在高尔基器中被修饰和拣选

在内质网腔内或膜上的蛋白质皆被转送到高尔基器 (Golgi apparatus)。后者是一垛扁

平的袋状膜结构（图29-47）。在此细胞器中糖蛋白的核心寡糖被修剪，也有新糖基加入。高尔基器还将糖蛋白加以拣选并包装，以便输送至不同的细胞区域。糖蛋白通过一种500Å直径的有刷形被膜包围的小泡（图29-48）被移至高尔基器的凸面。小泡被膜是具180kda包涵素亚

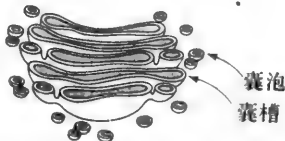
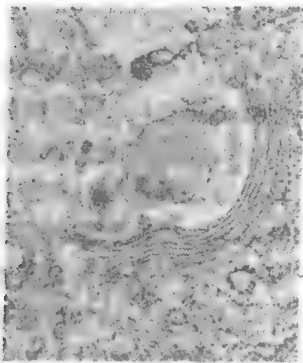


图29-47 高尔基器的电镜图（左）及示意图（右）。在此细胞器中糖蛋白得到修饰、拣选和包装。[电镜图蒙Lynne Mercer特许。]

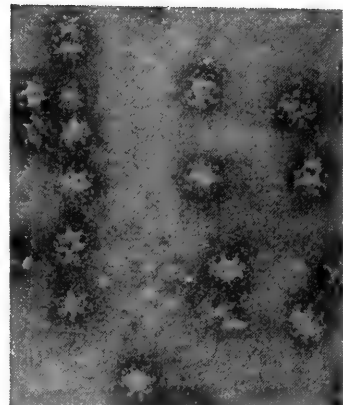


图29-48 被膜小泡的电镜图（上）及示意图（下）。[蒙Barbara Pearse 特许。]

基的多面体（图29-49）。这种被膜小泡由内质网突起，后与高尔基器融合。它亦能将膜蛋白质由高尔基器的凹面带至溶酶体、质膜及其它细胞区域。不仅如此，被膜小泡还能将质膜的蛋白质及脂类带到内膜上。因此包涵素在细胞内的膜转移中起关键作用。值得指出的是，在这些转运过程中，膜的不对称性仍得到保持。被膜小泡膜和高尔基膜的腔面与内质网膜的腔面相当。当一被膜小泡与质膜融合时，其腔面成为质膜的胞外面。因此，内质网膜及其它细胞器膜的腔面相当于质膜的外表面（图29-50）。故此质膜糖蛋白中的糖基总是在细胞外表面（171页）。

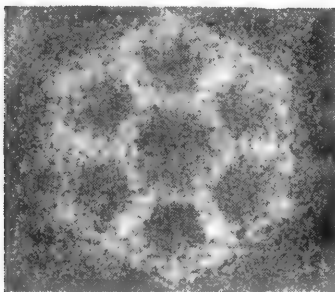


图29-49 被膜小泡的重组图象，由许多电镜图叠加组合制成。[引自M.P. Woodward and T.F. Roth, *J. Supramol. Struct.* 11 (1979): 240.]

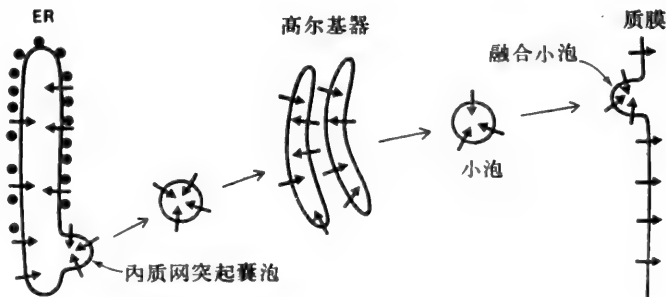


图29-50 细胞膜的不对称性：内质网及其它细胞器的腔面相当于质膜的细胞外表面。



在高尔基器中糖蛋白中的寡糖单位被重整。核心中剩下的一个葡萄糖基及数个甘露糖基

被修减。某些糖蛋白的糖单位的形成在此已完工。另外一些糖蛋白的糖链较复杂，需在已修减的核心上进一步依次加上糖基。例如，有些糖蛋白含有的末端三糖，是通过UDP-N-乙酰葡萄糖胺，UDP-半乳糖及CMP-神经氨酸这类活性供体来最后合成(图29-51)。在高尔基器中进行的最后阶段的糖化作用称为末端糖化，以区别于在内质网中进行的核心糖化。

在高尔基器中糖蛋白如何得到拣选并被输送至其最终目的地？这个诱人的问题目前尚无解答。但从I-细胞病(亦称粘脂症II)中可获得一些有意义的线索。这是一种溶酶体存贮疾病，通过常染色体隐性遗传。其特征是严重的意识运动衰退及骨骼畸形。I-细胞病患者结缔组织中的溶酶体中存贮大量未分解的聚氨基葡萄糖及糖脂的包含体。这种包含体的存在是由于在溶酶体中至少有八种分解它的酶缺失了。而在这些病人的血及尿中却相反地找到大量的酶。因此，具活性的酶虽然是合成了，但却被移至胞外而未能存在溶酶体中。换句话说，在I-细胞病中，一系列的酶被安错了地位。又发现这些酶中缺少正常含有的甘露糖6-磷酸。由此，也许可认为甘露糖6-磷酸是正常地指导许多水解酶由高尔基器转至溶酶体的标志。至于其它糖蛋白中的糖单位是否也参与指挥细胞内的交通来往，亦是有意思的问题。

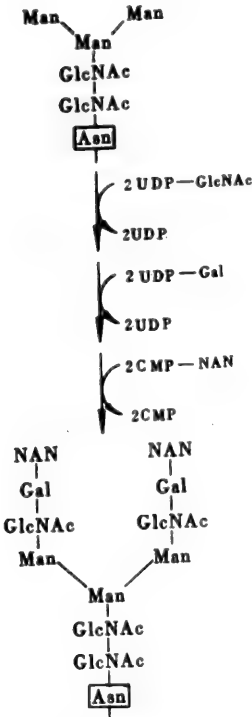


图29-51 糖蛋白(人转铁蛋白)中含神经氨酸糖单位合成的最后阶段。这个末端糖化在高尔基器中进行。

## 概 要

一个真核细胞染色体含有一个双螺旋DNA单分子，它比原核细胞的DNA分子至少要大100倍。DNA紧密地与称为组蛋白的碱性蛋白质结合着。染色质纤维是一条有柔软关节的核小体链。这一重复单位的核心组成是：一条含140碱基对的DNA，绕在由两个组蛋白2A，两个2B，两个3及两个4构成的组蛋白八聚体外面。核小体核心由联系段DNA串联起来；典型的联系段DNA长约六十碱基对，并与一分子H1结合在一起。核小体的形成使DNA的长度减少七倍，这是第一级的DNA缩短。真核细胞DNA从数千个起始点开始半不连续和半保留地进行复制。由于真核DNA比原核DNA长出许多，因此大量起始点是必要的。

对热变性真核DNA进行后复性动力学的研究，可知它们与原核DNA不同，含有许多重复碱基顺序。高度重复的DNA(卫星DNA)常处于着丝点附近。有些卫星DNA含有一个上万次重复的七核苷酸顺序。另一类是中度重复DNA。许多真核细胞中存在着数十以至数百个拷贝的rRNA基因及组蛋白基因。多数中度重复DNA可能具调节作用。第三类是单拷贝DNA，它们的序列在一个单倍体基因组中只出现一次(或仅数次)。不少主要蛋白质



如丝心蛋白、血红蛋白和卵白蛋白是由单拷贝基因编码。它们制出大量的稳定 mRNA。单拷贝序列常由中度重复性顺序间隔开来。在高等真核生物中，为蛋白质编码的许多基因也常以具有间隔顺序为其特点。

真核细胞的 RNA 由三类 RNA 聚合酶所合成。形成的初级转录本在由胞核输送到胞液成为成熟的 rRNA，tRNA 及 mRNA 之前，先要经过广泛的修饰。信使 RNA 是由长得多的初级转录本 (hnRNA) 经裂解和拼接后形成的。一真核信使具有 5' 端帽，也常含有 3' 端长的多聚 A 尾。它只具一个单翻译区，两旁皆有非密码顺序，后者有时可相当长。真核细胞中存在的 mRNA 群体与初级转录本的选择性加工及某些特定基因的转录速率有关。翻译水平的调节似乎对决定某一特定细胞合成什么蛋白质作用不大。80S 的真核核糖体由 40S 及 60S 的二种亚基构成。如原核细胞一样，需有一特异的起始 tRNA，但此 RNA 并未甲酰化。在真核细胞中起始是被一蛋白激酶级联反应所控制，其作用是导致起始因子 (eIF-2) 失活。线粒体及叶绿体具有它们自主的 DNA，并不含组蛋白，在这些细胞器中蛋白质的合成与细菌类似。

分泌性蛋白质及膜蛋白质皆由结合于内质网上的核糖体所合成。这些蛋白质多数含一强疏水性的氨基端序列，作为核糖体附着在内质网上的信号。新生多肽链即可主动地穿过内质网膜，以后此信号序列再在腔面被裂解。几乎所有由膜结合核糖体合成的蛋白质皆能获得一个或更多的共价结合糖单位。在内质网中，一个共同性的寡糖单位从活化供体——多萜醇上转移至特定的天冬酰胺侧链。糖蛋白以被膜小泡形式由内质网移到高尔基器。这些包涵素被膜小泡在多种膜交换中皆起作用。寡糖的修剪和末端糖化过程皆在高尔基器中进行。同样，糖蛋白在高尔基器中被拣选及输送至目的地，在拣选过程中，糖单位可能具重要性。

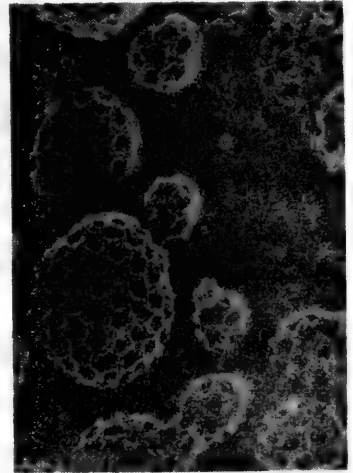
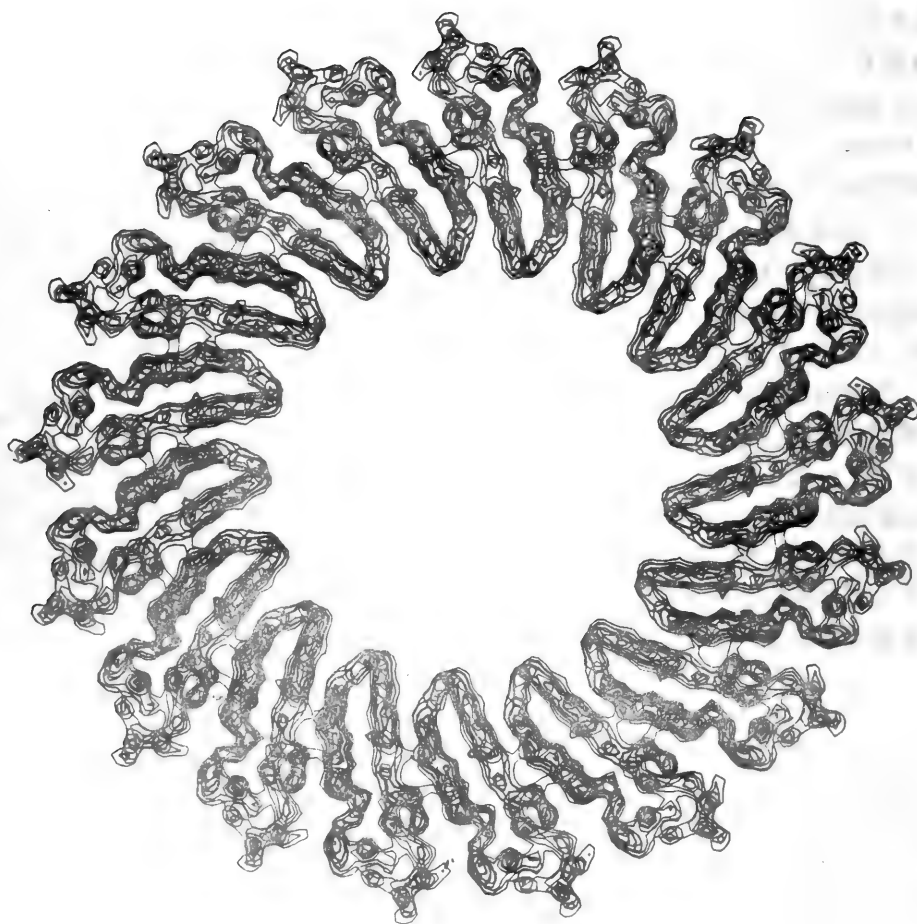


图 29-52 细胞质膜上的被膜小泡的电镜图。  
[蒙 Dr. John Heuser 特许。]



烟草花叶病毒的蛋白扁盘的电子密度图。[蒙 Dr. Aaron Klug 特许。]

## 第30章 病毒

病毒是由保护性外套封住的感染性核酸的小包装。它们是最有效的自我繁殖的细胞内寄生物。病毒不能产生代谢能量或合成蛋白质。它们和细胞的另外的差别是或含DNA或含RNA，而不同时含两者。某些病毒的核酸是单链的，另外的则可为双链。病毒的复杂程度大有不同，最简单的如Q $\beta$ ，是一个只含四个基因的RNA噬菌体，最复杂的是痘病毒，含约250基因。病毒复制完成的细胞外产物称作病毒粒子。在病毒粒子中，病毒核酸由蛋白质衣壳所封包，使不受酶解或机械破损，并使之进入易感宿主。在有些较复杂的动物病毒中，衣壳外面还包有含脂类和糖蛋白的被膜。

已经谈到，病毒研究对分子生物学的进展产生过深远的影响，例如信使RNA的发现。许多原因使人们对病毒在目前仍有很大兴趣。首先，病毒的增殖可作为细胞发育的一个模式，因为复制包括了基因的依次表达及大分子的装配以形成高度有序结构。病毒的基因数相对地较少，复制速度快，适于进行遗传分析，这些使病毒成为有价值的模式。其次，病毒为了解进化过程及宿主与寄生物关系的分子基础提供来源。其三，某些病毒造成实验动物肿瘤。病毒在人肿瘤形成中的作用也是当前集中研究的课题。



表30-1 病毒类型

核 酸	代表性病毒	约含基因数
单链 DNA	$\phi \times 174$ 噬菌体	5
双链 DNA	多瘤病毒	6
	腺病毒 2	30
	T 4 噬菌体	150
	牛痘病毒	240
单链 RNA	Q $\beta$ 噬菌体	3
	烟草花叶病毒	6
	脊髓灰质炎病毒	8
	流感病毒	12
	劳氏肉瘤病毒	4
双链 RNA	呼肠孤病毒	22

引自 B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, and W. B. Wood, Jr., *Microbiology* (Harper & Row, 1973)。

图30-1 由感染细胞中分出的 T4 病毒粒子的电镜图。[蒙 Dr. Jonathan King, Dr. Yoshiko Kikuchi, and Dr. Elaine Lenk 特许。]

小病毒的外壳由许多相同的蛋白质亚基构成

病毒外壳中氨基酸的总数总是超过其基因组中核苷酸的数目。例如，烟草花叶病毒

(TMV)粒子的蛋白质外壳含约340,000氨基酸残基,而其RNA只含约6,400核苷酸。1957年,克里克, F. 及沃森, J. 指出:病毒的蛋白质外壳不可能是一个大分子,也不会是由许多不同的小分子蛋白质组成,因为病毒核酸的量少,不足以为如此大量的氨基酸残基编码。另一方面,为使所有的核酸皆能封在其中,蛋白质外壳也不能减小。病毒采取了蛋白质亚基种类少(一种或几种)而每种数量很多的办法绕过了它们在遗传物质上的贫困。如TMV的外壳含有2,130个相同的蛋白质亚基(每个长158残基)。

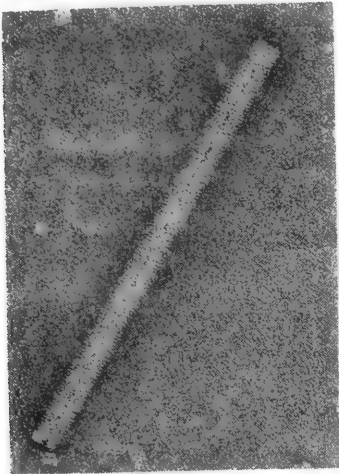


图30-2 烟草花叶病毒(TMV)粒子电镜图。[蒙Dr. Robley Williams特许。]

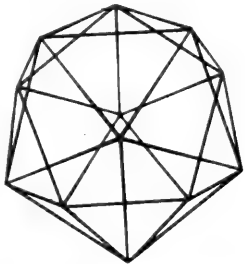


图30-3 二十面体模型。

将相同的亚基组成一个病毒外壳只有有限的几种方法。通过形成最大数目的键并多次应用同一性质的接触,可以获得稳定性。形成的结构还必是对称的。蛋白质外壳的排列有两种最为可能:一是具螺旋对称性的柱形外壳,另一是具二十面体对称性的球形外壳(图30-3)。事实上,所有的小病毒不是小棒

状就是球状(或此二形状的结合)。关于球形病毒的结构规律是由卡斯珀, D. (Donald Caspar) 及克卢格, A. (Aaron Klug) 推论的,他们从富勒, B. (Buckminster Fuller) 的建筑设计中获得不少启发。

关于球形病毒的结构规律是由卡斯珀, D. (Donald Caspar) 及克卢格, A. (Aaron Klug) 推论的,他们从富勒, B. (Buckminster Fuller) 的建筑设计中获得不少启发。

### 烟草花叶病毒(TMV)的自装配

关于病毒装配过程的最简单并最熟知的例子是TMV的装配。这一棒状病毒长3,000Å,直径180Å(图30-4),质量约为40,000kda。它的蛋白外壳含2,130个相同的亚基,紧密地以螺旋状装排于一含6,390核苷酸的单链RNA分子四周。RNA深埋在蛋白质中间,这使它不易受核糖核酸酶的攻击。每一蛋白质亚基与三个核苷酸相互作用。离解开来的RNA十分易变,而完整的TMV则可在十年中保持其感染性。

TMV的亚基间并非共价结合。它的蛋白质和RNA可以用诸如浓乙酸之类的试剂加以解离。1955年,弗伦克尔-康拉特, H. (Heinz Fraenkel-Conrat) 和威廉斯, R. (Robley Williams) 指出,解离的TMV外壳亚基和RNA,在合适的条件下能自动重装配成病

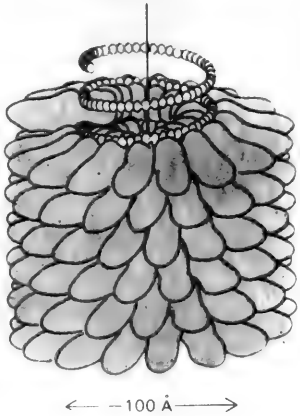


图30-4 部分TMV的模型,示蛋白质亚基螺旋式地绕在单链RNA分子四周。[依据A. Klug and D.L.D. Caspar, *Advan. Virus Res.* 7 (1960): 274.]

毒颗粒，后者在结构和感染性上皆与原来的TMV无区别。这是生物活性结构自装配的第一例。自装配过程即指在合适环境条件下组分自动组合，形成特异结构的过程。

在TMV 装配中蛋白质盘加到RNA 的环上

在TMV 装配中优先考虑的最简单的机制是单个蛋白质亚基逐个地加到RNA 上。但是，此机制的困难是核化过程必然很慢。在柔性的RNA 分子上必须加上十七个外壳亚基后，复合物才能闭成一圈螺旋并获得稳定性。但如果一下子在RNA 上就加上由许多亚基构成的复单位，而不是逐个地加上去，这个难题就得到解决了。事实上，外壳蛋白容易形成一个由34个亚基构成的二层扁平盘。盘的每一层是一个含17个亚基的环，这个数目与TMV螺旋一圈的亚基数( $16\frac{1}{3}$ )几乎一样。克卢格及其同事解决了盘的三维结构问题(图30-5)并证明它是TMV 装配的关键中间体。盘的关键性质是它的亚基能相互重叠并滑动以形成一个两圈螺旋，称互锁垫圈(图30-6)。

扁盘与TMV RNA的作用比外来RNA 迅

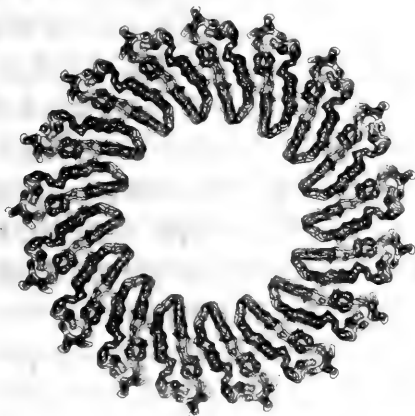


图30-5 TMV 蛋白质盘的电密度图。示一厚度为6 Å 的薄片。[蒙Dr. Aaron Klug 特许。]

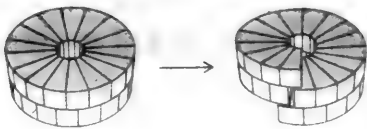


图30-6 TMV 蛋白盘转变为螺旋式的互锁垫圈示意图。[依据A. Klug, *Fed. Proc.* 31(1972): 40.]

速得多。因此，认为可能TMV RNA含有一能特异地被盘识别的碱基序列，后者在起始装配中起作用。这个起始区域通过下列方法已被分离提出：即将数个盘加到TMV RNA中以罩住其中的起始区，然后用核酸酶将RNA 的其余部分消化去掉，被罩护的片段含有一个约含六十五个核苷酸的核心顺序，它能与盘特异而牢固地结合。这个起始区的碱基顺序强有力地提示，它具发夹结构，由一个环及一个碱基配对的柄所组成(图30-7)。最有意思的是，环中每隔两个碱基就出现一个G。这种三联体重复型正好和每一病毒外壳亚基与三个核苷酸相作用的对应关系相符。因此，可能环是与第一个扁盘相结合，从而开始了病毒的装配。

令人惊异的是，起始环距离RNA 的两端皆较远。确实，这一装配起始点距RNA 的5'端约5,300核苷酸，距3'端约1,000核苷酸。另一意外情况是，RNA 的两尾端皆从生长着的TMV 粒子的同一边引出(图30-8)。3'端尾的长度在几乎全装配过程中不变，而5'端尾则在病毒粒子生长时变得短些。

一个可取的TMV 粒子形成过程模式列于图30-9。起始环首先插入二层蛋白盘的中间孔中，装配即由此开始。环与盘的第一圈结合，于是连着的碱基配对柄张开。此一相互作用促使盘转换成螺旋式互锁垫圈状，而由将病毒RNA 网罗于内。病毒螺旋即开始形成。另一盘跟着加到从中间孔中伸出的，新形成的RNA 环上。每加上一个盘就从生长病毒粒子的中间

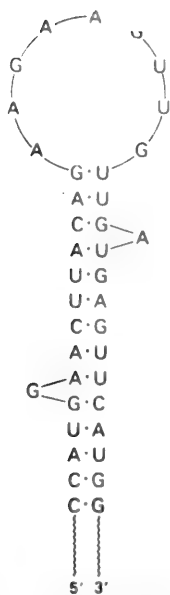


图30-7 病毒颗粒装配中TMV RNA的起始区。

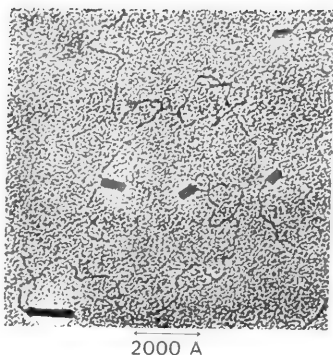


图30-8 部分重组的TMV颗粒的电镜图。由每一正在生长的病毒粒子中出来二条RNA尾部。[引自G. Lebeurier, A. Nicholai, and K. E. Richards, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 (1977): 150.]

孔中将RNA 5'端尾拉上来形成一新环。最后, 3'端尾通过尚不清楚的方式也被罩住。

双层盘显著地促进了封罩的特异性并保证迅速核化。一个盘可与含较多核苷酸的顺序结合, 而单个亚基则只能与三个核苷酸作用。因此, 盘在选择TMV RNA而不是宿主mRNA为封罩这件事上, 比单个亚基更有鉴别力。盘的另一重要特点是在生理条件下, 不会形成缺少RNA的螺旋。在此点上, 每个亚基中有两个羧基起重要作用。在中性pH时, 螺旋形式中两个羧基皆离解, 而在盘中仅有一个离解。由于螺旋形式

中这些靠近的羧酸盐的静电排斥, 盘的形式就有利。RNA与螺旋结合时可提供足够能量以克服静电排斥, 因此, 羧酸盐是一种反开关, 用于避免形成缺乏RNA的螺旋。

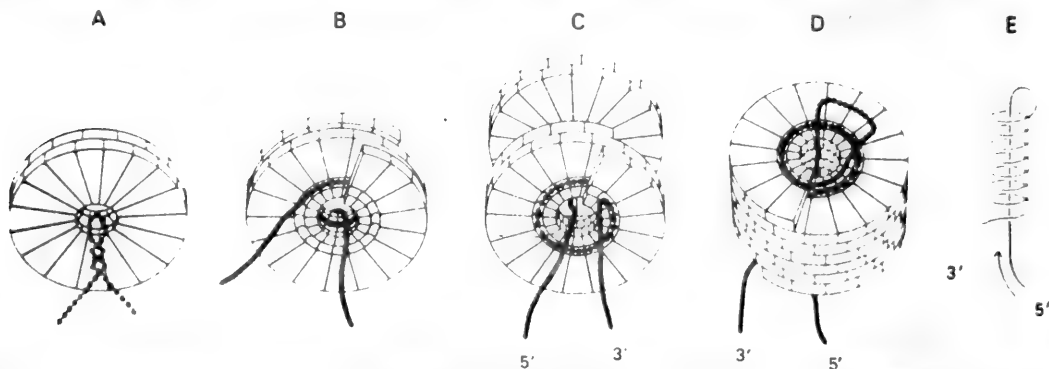


图30-9 TMV装配模式图: (A) RNA的起始部分钻入蛋白盘的中间孔中, 使盘转换成(B)螺旋互锁垫圈式; (C)更多的盘加到RNA环端; (D) RNA的一尾不断地由中间孔中抽上去与加进的盘相互作用; (E)部分装配病毒中的RNA示意图。RNA运动的方向以箭头示。[依据P. J. G. Butler and A. Klug, *The assembly of a virus.*]

## 经T4噬菌体感染后大肠杆菌的 大分子合成受到深刻改变

T4噬菌体是一个比TMV复杂得多的病毒。其双链DNA含有约165个基因, 而TMV只有6个。然而, 由于已做了大量的遗传和生化分析, 人们对T4的结构、增殖以及装配都

有很多认识。T4 病毒粒子有一头部，一尾部和六条尾纤维（图30-10）。DNA分子紧密地包装在一个二十面体的蛋白外壳内，形成病毒的头部。尾部由两根同心空管组成，与头部经一短颈相连。尾部有收缩性的鞘围绕中央芯子，DNA通过它注入细菌宿主。尾部终止部分是一底板，上面有六个短突起，带有六条细长纤维。

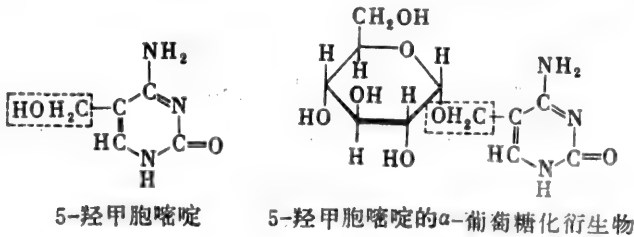
表 30-2 T4 噬菌体中的基因

类 型	数 目
代谢性，必需的	22
代谢性，非必需的	60
粒子装配，结构蛋白质	40
粒子装配，其它蛋白质	13
已知基因的总数	135

引自W.B.Wood and H.R.Revel, *Bacteriol Rev.* 40 (1976): 860.

尾纤维的末端与大肠杆菌的特异位点结合。尾鞘在ATP推动下进行收缩，从而将噬菌体头部拉向底板及尾纤维，这使中央芯子插进细胞壁但未能穿过细胞膜。然后裸露的T4 DNA穿透细胞膜。几分钟以后，所有细胞的DNA、RNA和蛋白质的合成皆停止，而病毒的大分子合成开始进行。换言之，感染性病毒现在占有了细胞的合成机器并以其基因取代了细菌的基因。

T4 DNA含有三套基因，它们在感染以后的不同时期：即早期、迟早期及晚期被转录。早期基因在T4 DNA合成前就被转录及翻译。这些基因所编码的某些蛋白质负责关闭细胞大分子合成。感染之后不久，宿主细胞的DNA就被由T4早期基因编码的脱氧核糖核酸酶所降解。此酶并不降解T4 DNA因为后者不含密集的胞嘧啶团。T4 DNA含有5-羟甲胞嘧啶（HMC）而不是胞嘧啶。而且，有些T4 DNA中的HMC残基还是葡萄糖化的。



因为在感染早期合成了由噬菌体决定的一些酶类，所以T4 DNA含有上述胞嘧啶的衍生物。其中一种酶将dCTP水解成dCMP，以阻止dCTP掺入T4 DNA。dCMP再被第二种酶羟甲基化，形成5-羟甲胞嘧啶核苷酸（dHMCMP）。第三种酶使dHMCMP转变成三磷酸盐，后者是DNA聚合酶的底物。最后，DNA中一些HMC碱基被第四种酶糖化。

晚期蛋白质的合成与T4 DNA复制偶联。在此时期，衣壳蛋白质和一个溶菌酶生成。当

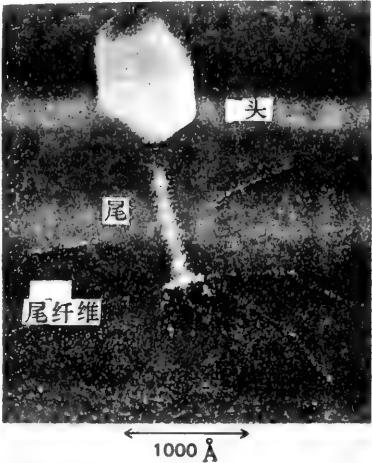


图30-10 T4 噬菌体的电镜图。[引自R.C. Williams and H.W. Fisher, *An Electron Micrographic Atlas of Viruses*, 1974. 蒙 Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Illinois 特许。]



子代病毒的装配完成时，溶菌酶就将细菌细胞壁消化并使之瓦解。在感染约20分钟后，就大致有二百个新病毒粒子出现。

### 支架蛋白质及蛋白酶参与T4噬菌体的有序装配

T4的装配过程比TMV要错综复杂。T4的衣壳有更高度的结构组织并含有约四十种蛋白质。另外还有十三种蛋白质参与此病毒的建造。通过遗传学、生物化学及电镜技术的联合应用，T4装配的机制已较明朗。伍德，W. (William Wood) 和埃德加，R. (Robert Edgar) 利用在装配中有缺陷的T4变种进行的研究揭示出：

1. 病毒的建造有三种主要途径。它们互不依赖地形成头部，尾部及尾纤维(图30-11)。一个组分的形成被堵塞并不影响其它二者的合成。

2. 每一途径皆严格地按一定的先后顺序进行。全部衣壳蛋白质是在感染周期的后半段同时合成的。因此，中间体本身的结构特点大有助于保证头、尾和尾纤维装配的次序性。途径中的任一组合都只有在前一步骤完成后才以有意义的速度进行。每一步骤的结合能量，可能被部分用于降低下一复合物形成所需的活化能，从而提高了下一步骤的速度。

3. 头与尾必首先合成，然后二者才能结合。以后制成的尾纤维再连结于底板。严格的按序步骤又保证只有完整的病毒粒子能形成。

T4病毒粒子的建造并非只靠自装配。相反，支架蛋白质和蛋白酶在装配过程的某些阶段起了必不可少的作用。例如，三个不参与最后结构的蛋白质是形成尾部底板中央塞子所需的蛋白质。这些支架蛋白质作为过渡性模板，在塞子组合过程中起促进作用。蛋白酶则在头部装配中有显著作用。头部有一个45kdaI的主要蛋白质，称gp 23\* (gp代表基因产物)，是由其55kdaI前体gp 23衍生而来的。这一裂解是在部分头部装配好时发生的，这提示它可能引发了DNA的进入。另外三个头部蛋白质也知是在装配时裂解的。因此，T4是通过自装配、支架协助装配及酶导引装配三者的结合构成的。

### T4 DNA通过不等长对应体中间物的生成得到复制

在诸如T4 DNA这样的线状DNA分子的复制中遇到了一种特殊困难。新生的子代DNA

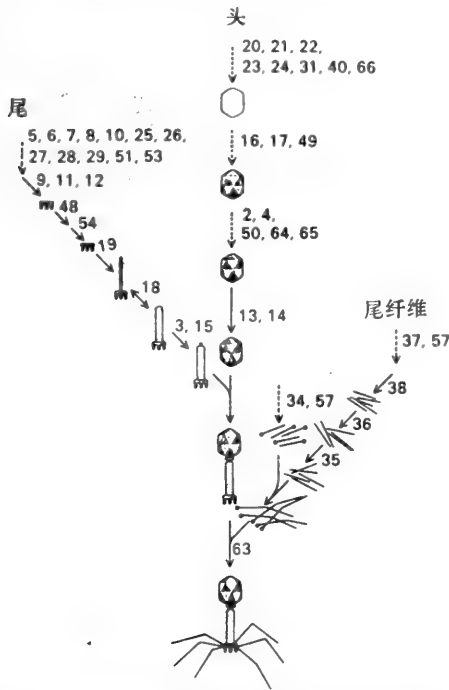
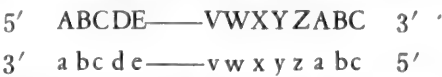


图30-11 T4噬菌体形态发生途径。箭头旁边的号码代表在装配中某一步骤所需的基因产物。[引自W. B. Wood, *Genetic Mechanisms of Development*, F. H. Ruddle, ed. (Academic Press, 1973), p. 29]



链的5'端是不完全的，因为那里的RNA引物已被去除而并未由DNA取代（图30-12）。我们记得，DNA聚合酶不能进行从3'→5'端的合成，亦不能开始链的新合成（453页）。在环状DNA分子的复制中不存在此难题，因为新链的3'端可作为引物以完成子代链的全合成。T4以及其它具线状DNA基因组的病毒如何解决此困难？人们发现这类线状DNA分子具有**多重性末端**——即DNA左端的碱基顺序在右端得到精确的重复：



而且，当这些DNA分子复制时，有长的**不等长对应体**（Concatamers）产生。这些发现为子



图30-12 新合成的线状DNA分子的5'端尚不完全。亲代两股DNA以粗线表示，子代股以细线表示。

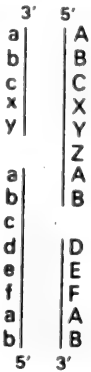


图30-13 线状DNA双链复制中的不等长对应体中间物。不完全的双链DNA分子通过它们互补的单链末端相互结合（AB对ab）。空缺部分接着进行补齐。

代DNA链5'端的完成提供了机制。新生的双链可以很快地相互结合，因为它们单链的尾是彼此互补的（图30-13）这种互补性是由末端碱基顺序的重复而引起的。不等长对应体的一个双链的3'端就可作为引物，以补齐新DNA分子重复链中下一段双链中的5'端空隙。

### T4 DNA插入到预制的头部

一个单位长度的DNA分子如何形成并装入噬菌体的头部？这是一个巨大的难题：DNA的轮廓长度是 $56\mu\text{m}$ ，但它必须装进一个长轴只有 $0.1\mu\text{m}$ 的头部内。此外，DNA的体积 $(1.8 \times 10^{-4} \mu\text{m}^3)$ 并不比头部体积 $(2.5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^3)$ 小多少。优先的可能是DNA被引入预制的头部，或者也可在紧缩的DNA核心外将头部装配起来。现在已分离得到能包装DNA的空噬菌体头，因此强有力地提示，是**T4 DNA插入到预制的头部**（图30-14）。当DNA进入头部，并绕成似椭圆形的一束纱团状结构时，头内有些蛋白质裂解。同时头部有些膨胀。最后，当一个单位长度的基因组进入头部后，不等长的多余DNA裂解去掉。核酸酶对DNA的裂解发生在头部充满时而不是在它识别特异序列时，因此T4 DNA分子具有环形交

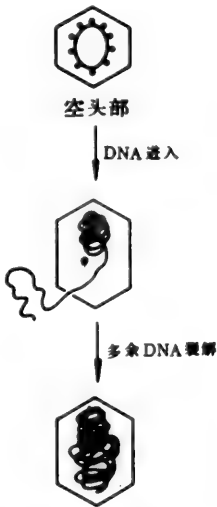


图30-14 T4头部内DNA的填装示意图。

换末端。DNA的填装方式使它能在再次感染时很迅速地注入细菌内。这一值得注意的活性的结构基础尚是一个谜。

## TBSV外壳蛋白的柔性使它形成二十面体壳

一种球形病毒——番茄丛缩病毒 (TBSV) 可以作为另一种病毒建造原理的例子。TBSV 含

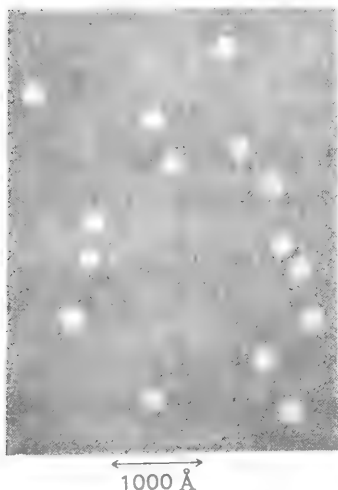


图30-15 番茄丛缩病毒的电镜图。[蒙 Dr. Robley Williams 特许。]

单一的RNA分子 (4,800核苷酸)，其外面包以由180个相同蛋白亚基 (每一亚基是41kda) 构成的外壳。这些外壳亚基是如何安置的？可能存在的等边外壳的最高对称性约为60，这在二十面体中出现 (图30-16A)。换言之，能精确地对称地排聚在一起形成一球形壳的相同亚基不可能超过60个。然而，TBSV及其它一些球形病毒却含180个相同亚基。用180个，而不是用60个同样大小的亚基造一个壳，其生物学意义是使较大的病毒粒子得以容纳较多的核酸。这不是通过取消而是通过略为放松对称性而实现的 (图30-16B)。哈里森，S. (Stephen Harrison) 用高分辨率 x 射线分析研究TBSV 结构的结果表明，其具化学同一性的外壳亚基可分为三组 (A, B, C)，每组有60个严格遵循二十面体对称性的蛋白质。然而，不同组内成员间的相互关系略有不同，因此称它们为类相同。

类相同的物理基础是什么？x 射线分析表明，每一亚基包括一个构成部分表面壳的S结构域、一个向外伸出的P结构域及一个内向的氨基末端臂。在所有的亚基内，P及S结构域的结构皆几乎相同。相反，在C亚基中P与S结构域间

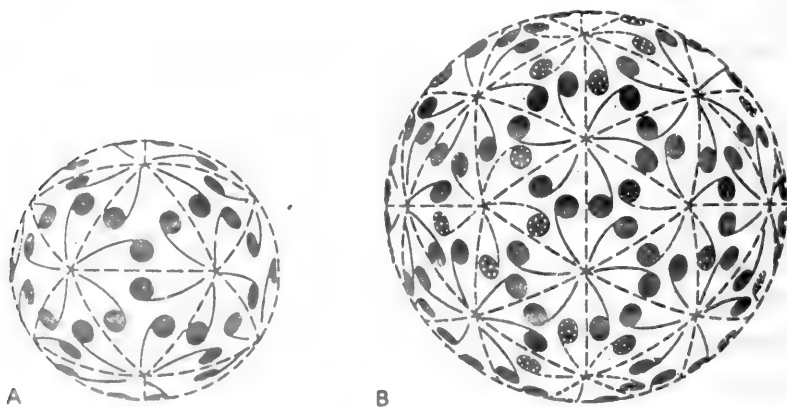


图30-16 二十面体表面晶格，由(A)60个严格相同的(B)180个类相同的亚单位构成。注意在A中所有的尾-尾接触皆成5环状，而在B中有些接触成5环，有些为6环。[依据S.C. Harrison, *Trends Biochem. Sci.* 3 (1978): 4.]

的夹角则与A及B亚基中的迥然不同；P及S间由一角宽至少为20度的绞链连接。另外一个区别是C亚基中的氨基末端臂是有序的，而在其它亚基中则极无规律。这些灵活的模式使不

同组的亚基能以几乎相同的形式相互作用，这对自动装配十分必要。另一方面，包裹在内的RNA却似并无高度确定的结构。外壳亚基灵活的氨基末端臂伸入内部并与RNA相互作用。

### 细菌限制性核酸内切酶使外来DNA分子裂解

已述及T4噬菌体具有特异降解宿主DNA的酶机构。同样，细菌也含有裂解外来DNA分子的限制性内切酶。这些酶是从下列实验中顺便发现的。人们观察到能在某一株细菌（例如大肠杆菌B）中传代的噬菌体，在另一株（例如大肠杆菌K）中却不能很好生长，相反亦然。这些噬菌体遇到与其繁殖所处的原株不同株系时就被称为受限制。然而，仍有小部分（约 $10^{-5}$ ）噬菌体能逃过限制并在新宿主中生长良好，它们随即失去在原宿主中的生长力。这些发现提示，宿主特异的修饰作用保护了噬菌体使不受宿主限制。接着阿尔伯，W.（Werner Arber）说明，所谓宿主特异修饰实际上发生在噬菌体DNA上，而限制实是噬菌体DNA降解的后果。宿主DNA和其它被宿主留居的DNA在某些特异位点上被甲基化了。这些位点就是限制性核酸内切酶的识别点，该酶又作用于未甲基化的部位；即是说，在靶顺序中某一特定碱基的甲基化阻止了限制性酶的水解作用（图30-17）。时间性十分重要：细菌DNA因为先被甲基化所以不会被降解。刚复制好的细菌染色体只在亲链上甲基化，亦不受限制性酶作用。这个半修饰的DNA在下一轮复制前成为全甲基化的。

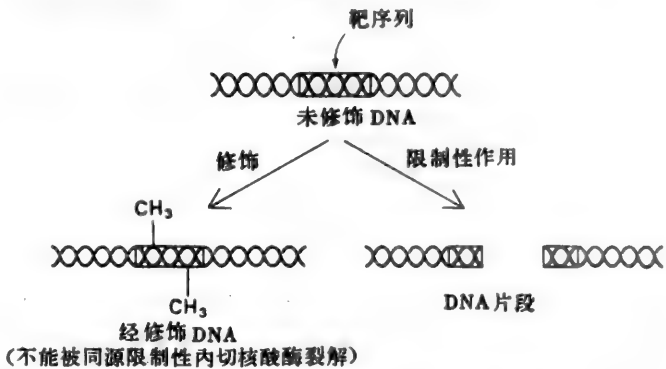


图30-17 靶位点的甲基化阻止了相应限制性核酸内切酶的裂解作用。

细菌中有二种类型限制-修饰系统存在。在I型系统中，甲基化酶和核酸酶的活性与一个大的多亚基复合物相联系。例如，大肠杆菌B和K复合体就含三类多肽链。 $\alpha$ 链具内切核酸酶活性， $\beta$ 链有甲基化酶活性， $\gamma$ 链含有对DNA的识别位点。I型酶需要S-腺苷甲硫氨酸及ATP以表现其核酸酶及甲基化酶活性。I型酶能在距识别位点5'端侧一千或多于一千碱基对的任意点上裂解未经修饰的DNA，并同时ATP水解。相反，在II型系统中，甲基化酶与核酸酶是分开的。S-腺苷甲硫氨酸在修饰反应中是甲基供体，但不参与DNA的裂解。另一区别是，II型核酸酶及甲基化酶不需要ATP。最引人注意的是，II型裂解是高度特异的。前章（459页）曾讨论过，这类酶中有多种能识别一特异的四至六碱基对序列，并将此区中每个链的一个磷酸二酯键水解。此种裂解位点的显著特点是它们具有二重旋转对称性（图30-18）。限制性酶是分析DNA结构（460页）和建造新DNA分子（596页）必不可少的工具。

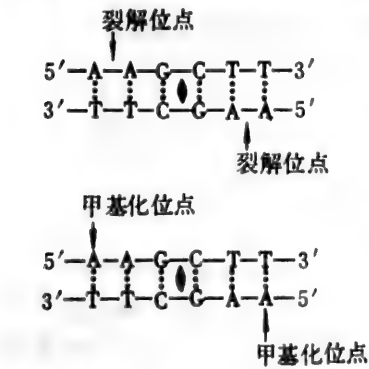


图30-18 Hind III限制性内切核酸酶（由流感嗜血杆菌中获得的）及相应甲基化酶的特异性：黑点记号指出二重对称轴。

## RNA病毒复制的战略

在RNA病毒的复制中有一个特殊的难题,因为未感染的宿主细胞缺乏按RNA模板提供的指令来合成RNA的酶系。其结果是,为了合成RNA指导的RNA聚合酶(亦称RNA复制酶或RNA合成酶),或RNA指导的DNA聚合酶(亦称反转录酶),RNA病毒必须含有相应的遗传信息。按病毒粒子RNA和mRNA之间的关系将RNA病毒分类,是有指导意义的。根据惯例,mRNA被定为(+)RNA,而其互补体为(-)RNA。RNA病毒的复制和转录已知有四条途径(图30-19)。1类病毒(如脊髓灰质炎病毒)是正链RNA病毒。它们

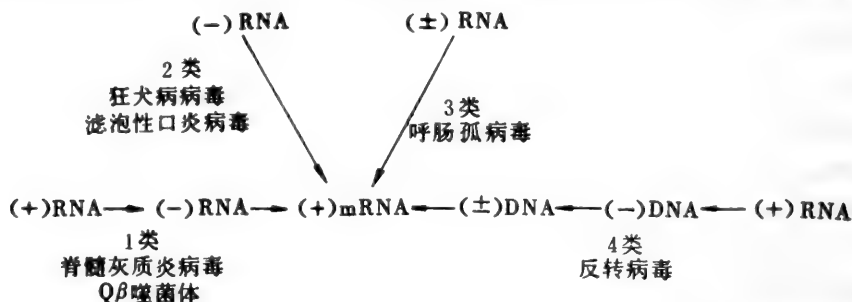


图30-19 RNA病毒的基因表达方式。[依据D. Baltimore, *Bacteriol. Rev.*, 35(1971): 326.]

合成(-)RNA,后者再作为模板以形成(+)mRNA。2类病毒(如狂犬病病毒)是负链RNA病毒,这种病毒粒子的(-)RNA是合成(+)mRNA的模板。3类病毒(如呼肠孤病毒)是双链RNA病毒,它们的病毒粒子(±)RNA指导(+)mRNA的非对称性合成。4类病毒是最不寻常的,即反转病毒(如劳氏肉瘤病毒)。这些病毒粒子中(+)RNA中的遗传信息是通过一个DNA中间物表达的,此DNA是合成(+)RNA的模板。因此,在反转病毒中信息流是从RNA至DNA后再回到RNA。

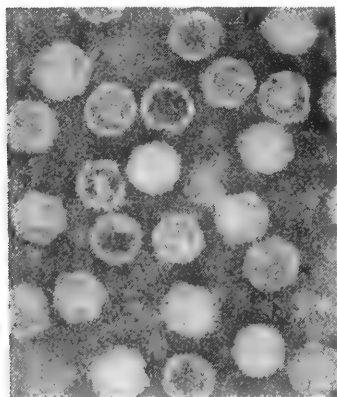


图30-20 脊髓灰质炎病毒颗粒的电镜图。  
[蒙Dr. John Finch特许。]

脊髓灰质炎病毒蛋白质由巨大前体  
通过多点裂解形成

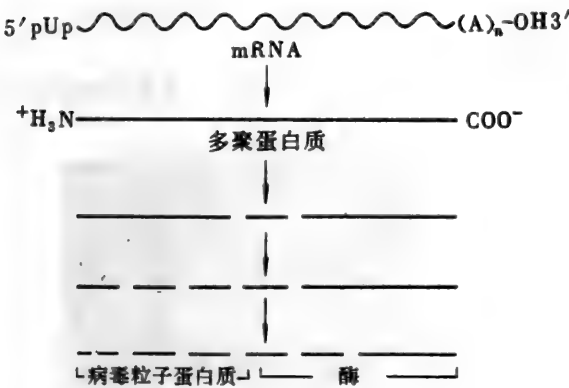
脊髓灰质炎病毒是由一个二十面体衣壳内包含一个7.5 kb单链(+)RNA组成的。这种病毒RNA分子在进入它的宿主胞浆后,起信使作用。它可由宿主核糖体翻译形成衣壳蛋白质及一特定的按RNA模板指令的RNA聚合酶(RNA复制酶)。然后病毒粒子(+)RNA指

小RNA病毒——一组小(pico)RNA(rna)病毒。一个单链(+)RNA分子,周围绕以二十面体蛋白质外壳(直径270Å)。脊髓灰质炎病毒,鼻病毒(普通伤风病毒)和导致牲畜口蹄病的病毒等属小RNA病毒。

导此RNA复制酶合成(-)链(图30-21)。依次,此(-)RNA即作为模板以合成更多的(+)RNA,它们可作为信使亦可纳入衣壳成为新病毒粒子。

脊髓灰质炎病毒基因表达的显著特点是病毒粒子(+)RNA是合成多于两千残基的一个连续的多肽链的信使分子。巴尔蒂莫尔,D.(David Baltimore)表明,宿主蛋白酶可将此巨型多肽裂解成七个蛋白质:四个外壳蛋白质,一个RNA复制酶及二个未知功能的蛋白质(图30-22)。新生的多肽链先被分裂成三段,然后进一步裂解。更确切地说,二个衣壳蛋白质在病毒粒子装配的最后阶段才由前体形成。

为何脊髓灰质炎病毒用这个看



来颇为复杂的途径合成其蛋白质?原因是别无它法。我们记得,在真核细胞中,虽然原因不明,一个mRNA分子只能译出一条多肽链。与之相反,原核细胞的mRNA则常属多顺反子类(例lac mRNA)。因此,脊髓灰质炎病毒用裂解多聚蛋白质途径以克服其动物宿主细胞的制约。

图30-22 由巨型多肽前体,通过多点裂解,合成脊髓灰质炎病毒蛋白质。

### 滤泡性口炎病毒(VSV)依其RNA基因组转录形成五个单顺反子mRNA

滤泡性口炎病毒(VSV,一种较温和的牲畜病原体)和狂犬病病毒表现第二种方式的基因表达。它们的病毒粒子含有不作为信使的单链(-)RNA分子。因此,在其表达过程中,第一步是合成(+)mRNA。未感染的细胞缺乏一种RNA复制酶,所以,这些病毒必须在其病毒粒子中携带此酶并将后者注入感染细胞。事实上,VSV病毒粒子中五个蛋白质中的二个进行RNA复制。200kdal的L(large,大)蛋白和45kdal的NS(nonstructure,非结构

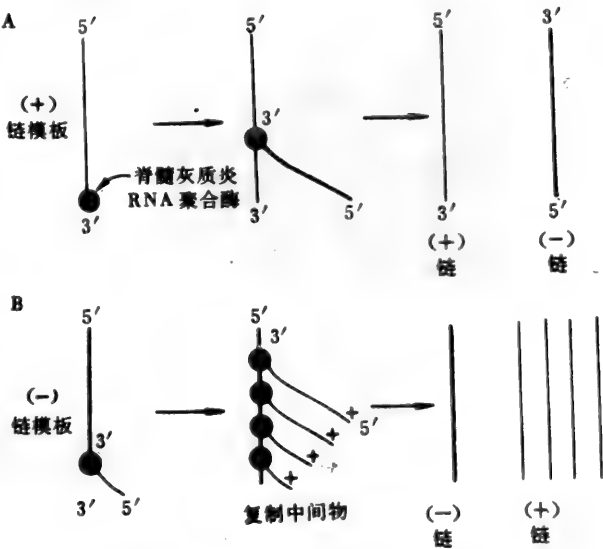


图30-21 脊髓灰质炎病毒RNA的复制。

棒状病毒(rhabdoviruses)——是子弹状病毒,如滤泡性口炎病毒及狂犬病病毒,其名来自希腊词rhabdo意短棒。

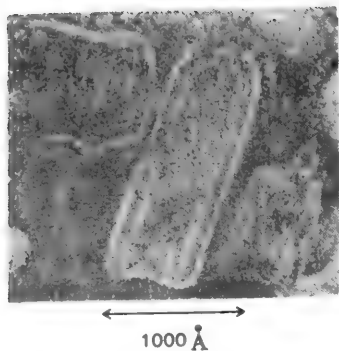


图30-23 滤泡性口炎病毒的电镜图。[引自R.C. Williams and H.W. Fisher, *An Electron Micrographic Atlas of Viruses*, 1974. 蒙 Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois 特许。]

性) 蛋白, 虽然量很少, 却是感染所必需。病毒粒子中的主要蛋白质是N蛋白, 它是一个50kda的核衣壳蛋白, 基因组RNA与许多个N蛋白复合在一起。VSV外面还包有一脂类双层, 这是病毒由细胞中芽出时从宿主质膜上获得的(图30-23)。膜上的突起来自G(glycoprotein, 糖蛋白)蛋白, 它是个由病毒编码的65kda蛋白质。还有一个称为M(matrix, 基质)的29kda蛋白质, 存在于包被和核衣壳之间。这五个VSV蛋白质是通过五个(+) mRNA的翻译而不是通过多聚蛋白质的裂解而形成。这个RNA复制酶还负责合成一个长(+) RNA分子, 后者含有病毒的所有遗传信息。这个完整(+) RNA再作为模板以合成(-) RNA, 后者装配成新病毒粒子。

### 呼肠孤病毒的基因组由十个不同的双链RNA分子组成

呼肠孤病毒是感染哺乳动物细胞的双股RNA病毒, 它是病毒遗传系统第三种方式的代表。此病毒粒子的核心含有结合着蛋白质的十种不同的双链(±) RNA分子。进入宿主时, 病毒粒子失去其由三种蛋白质组成的二十面体外壳。外壳的去除使处于病毒粒子核心的RNA聚合酶激活。此RNA指导的聚合酶能完全地将十个(±) RNA分子转录, 由此形成的(+) mRNA与其基因组片段等长。(±) RNA模板的转录是非对称性及保留性的, 即只形成(+) RNA, 而且原有(±) RNA双体并不拆散。这些mRNA的5'端被核心中的酶加帽, 然后经过核心通道被排出(图30-25)。由此可知, 为合成mRNA其核心必是一个高度有组织的装备。十个mRNA皆各被翻译成一种蛋白质。然后全套十个(+) mRNA分子再与若干病毒蛋白质联结形成一个核心前体, 在前体上再合成十个(-) 链。

为什么呼肠孤病毒的基因组是分节段的? 如前所述, 动物病毒没有多顺反子mRNA。脊髓灰质炎病毒通过裂解巨型蛋白绕过这一限制, 滤泡性口炎病毒则将其病毒粒子RNA转录

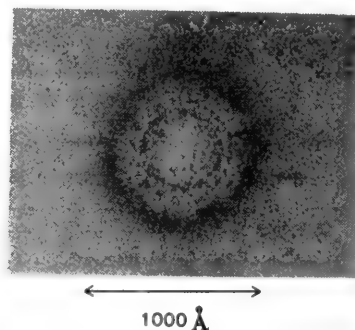


图30-24 呼肠孤病毒电镜图。[引自R.C. Williams and H.W. Fisher, *An Electron Micrographic Atlas of Viruses*, 1974. 蒙 Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois 特许。]

呼肠孤病毒(reovirus)——由人类或其它哺乳类呼吸道及肠道中分离出的一种双链RNA病毒, 尚未见致病性。reovirus是由respiratory(呼吸), enteric(肠), orphan(孤儿)拼合而来, 意为孤立于疾病外的病毒。

成与各蛋白质相应的许多短mRNA。而呼肠孤病毒所用的战略则是为每一蛋白质的合成准备一个单独的染色体。

RNA病毒的第四种遗传信息表达方式是将一个DNA中间体整合到宿主基因组中去。这一较复杂的遗传系统存在于反转病毒(RNA肿瘤病毒)中,将在本章后面(583页)讨论。

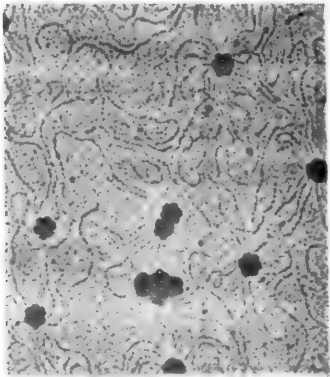


图30-25 呼肠孤病毒核心合成mRNA。由暗色核心上射出的线形物是mRNA分子。[引自N.M.Bartlett,S.G.Gillies,S.Bullivant, and A.R.Bellamy, *J. Virol.*, 14(1974): 324.]

### 小RNA噬菌体含有交搭基因

RNA噬菌体如R17(MS2, F2)及Q $\beta$ 是很简单的病毒。它们皆是有规则的多面体,直径约200Å。这些密切相关的噬菌体的衣壳,含有180个分子的外壳蛋白(14kda)和一分子的A(成熟)蛋白(38kda)。

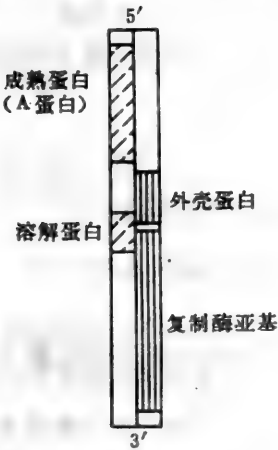


图30-26 R17及Q $\beta$  RNA中的交搭基因。其中一个读码框架用斜线,另一用竖线表示。

其单链(+)RNA也为复制酶的亚基编码。到最近为止,一直认为这类小RNA病毒只含三个基因。然而,后来发现一个噬菌体变种,它能组成正常病毒粒子但不能溶解宿主细胞,这促使人们探寻由病毒编码的另一蛋白质。果然,此类RNA噬菌体的确含有第四个为溶解细菌宿主的蛋白质编码的基因。这种溶解蛋白的基因与外壳蛋白的和复制酶亚基的基因相互交搭(图30-26)。此类小RNA噬菌体和小DNA噬菌体 $\phi$ X174(494页)一样,利用交搭基因方式使小基因组中容纳更多信息。病毒粒子的(+)RNA分子既作为四个蛋白质合成的信使,又是合成(-)RNA的模板。然后,(-)RNA再作为产生更多拷贝(+)RNA的模板。因此,这些噬菌体的遗传系统与脊髓灰质炎病毒类似。

合成(+)链及(-)链噬菌体RNA的复制酶是一很有趣的酶。它对同源噬菌体RNA十分特异。因此,宿主RNA分子不与噬菌体RNA竞争复制。Q $\beta$ 复制酶有四个亚基,其中只有一个由Q $\beta$  RNA编码。复制酶另三个亚基是宿主蛋白质,但被噬菌体转为己用。其中两个是蛋白质合成中的延长因子,EF Tu及EF Ts,第三个是30S核糖体亚基的组成成分。因此,Q $\beta$ 以十分经济的办法创造了一高度特异的酶。

调控机制保证复制及翻译在适当的时候进行。此(+)RNA既是蛋白质合成的信使又是(-)RNA合成的模板。两个过程在同一(+)RNA上同时发生将是不适宜的,因为核糖体由5'→3'方向前进就将与复制酶由3'→5'方向行进发生碰撞。这情况实际不会发生,因为在足够量的(-)RNA合成之前,Q $\beta$ 复制酶强烈地抑制核糖体与(+)RNA结合。



这四个噬菌体蛋白质合成的量有所不同。在感染全过程中合成的外壳蛋白质是主要的翻译产物。原因之一是核糖体与外壳顺反子的起始位点的结合比与(+)RNA上的任何其它起始位点的结合都牢固得多。而且,外壳蛋白还通过堵塞复制酶的起始位点而抑制该酶的翻译,因此,外壳蛋白是一特异的翻译阻遏物。A蛋白只从未完成的新生(+)RNA分子上被翻译,因为在完成的RNA分子上,由于碱基配对会阻塞其起始位点。完全的RNA分子的二级结构只容许少量A蛋白形成。

## 噬菌体RNA在细胞外的达尔文式进化

有了纯制的Q $\beta$  RNA和不含污染的核酸酶的Q $\beta$ 复制酶后施皮格尔曼,S.(Sol Spiegelman)利用它们研究了活细胞外的进化过程。所要解答的一个问题是:如果只要求它们以最大速度繁殖的话,这些RNA分子将会出现什么情况?实验是将Q $\beta$  RNA分子,Q $\beta$ 复制酶与核糖核苷三磷酸一起保温20分钟;这个保温时间对筛选迅速复制的RNA分子变种最为适宜。由其中取出一份来,放入含Q $\beta$ 复制酶及核糖核苷三磷酸的标准反应液中稀释。一共做一系列共七十五个如上述的取样转移,并分析其中的RNA产物。保温时间要作定期的缩短,因为当实验进行下去时RNA分子的复制会越来越快。令人注目的结果是,经七十五次取样(“传代”)后,RNA分子的长度只是原始Q $\beta$  RNA的12%。由于后来形成的短缩了的分子能更迅速地复制,所以复制中不必要的核苷酸皆丧失掉了。此实验主要的条件是变种必须保留能被复制酶识别的起始顺序。

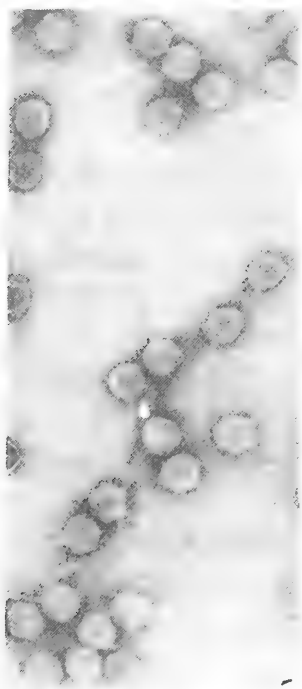


图30 27  $\lambda$ 噬菌体的电镜图。[蒙Dr.A. Dale Kaiser特许。]

## 溶原噬菌体能将其DNA 插入宿主细胞DNA中

某些噬菌体能选择其生活方式:它们可繁殖并使感染细胞溶解(溶解途径),或者它们的DNA与感染细胞联合,在那里保持其繁殖及溶解性能(溶原途径)。并不一定杀死其宿主的病毒称温和病毒。其中最熟知的是 $\lambda$ 病毒;关于其转录控制已在前面(530页)述及。我们记得 $\lambda$ 阻遏物与两套操纵基因位点( $O_L$ 及 $O_R$ 区)结合,并能调节其自身合成。

$\lambda$ 病毒粒子的DNA是线形48-kb双螺旋。在此线形DNA分子中,每链的5'末端都有一含十二核苷酸的单链序列。此序列称为粘性末端,因为它们彼此互补,能相互形成碱基配对。事实是感染之后,粘性末端就来到一起。于是,每链的5'磷酸端就与自己的3'羟端靠近。宿主DNA连接酶将这二个口闭合,形成一环形 $\lambda$ DNA分子(图30-28)。

这种环形 $\lambda$ DNA分子,借 $\lambda$ 蛋白质与宿主DNA复制机器的相互作用而得到复制。另一种



可能是，λDNA环可插入细菌染色体中，这是由于λDNA及大肠杆菌DNA皆有特异的含十五碱基对的附着位点，它们之间能进行单个相互重组。大肠杆菌DNA上的λ附着点称为 $att\lambda$ ，它处于 $galE$ 和 $bioA$ 之间(它们分别是半乳糖 $gal$ 及生物素 $bio$ 操纵子上的基因)。 $att\lambda$ 的碱基序列可用B-B'符号代表(B代表细菌，bacterial)。λ上的特异附着点称 $att$ ，处于基因 $int$ (代表integrate, 整合)和 $xis$ (代表excise, 切除)之旁。 $att$ 的碱基序列标以符号P-P'(P代表噬菌体，phage)。 $int$ 蛋白识别噬菌体DNA的P-P'序列及大肠杆菌DNA的B-B'序列，接着就进行相互转移：P与B'结合，B与P'结合。这一模式(图30-29和30-30)最先是坎贝尔，A. (Allan Campbell)根据遗传验证提出的。

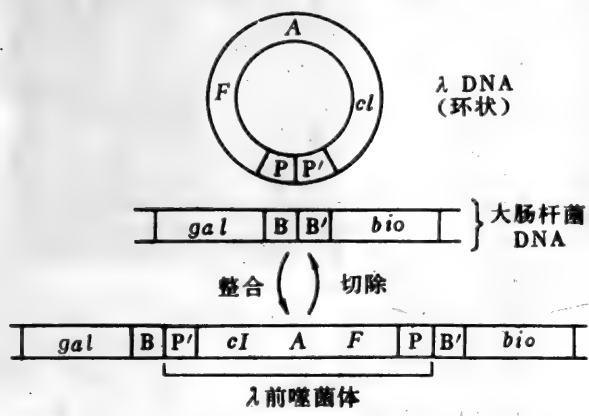


图30-29 λDNA和大肠杆菌DNA的相互重组示意图。

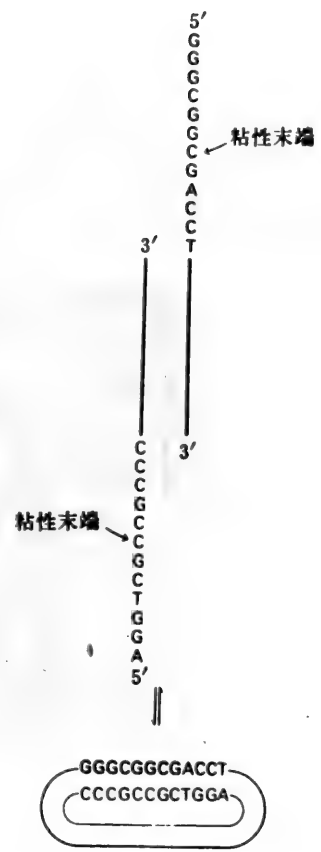


图30-28 线形λDNA转变成环形结构。

这样，λDNA成为大肠杆菌DNA分子的一部分。这种形式的λ称为前噬菌体，含有前噬菌体的大肠杆菌细胞称为溶原细菌。前噬菌体在无 $xis$ 蛋白存在时是稳定的。 $xis$ 基因的转录被λ阻遏物所阻挠(529页)。当阻遏开放后， $xis$ 及 $int$ 蛋白就一起催化B-P'及P-B'序列的拆开及下一个相互转移(图30-30)：P与P'，B与B'重新接合，恢复环形λDNA分子及非溶原大肠杆菌染色体。这个重组系统的关键特征是 $int$ 蛋白单独不能识别在前噬菌体两端的新序列(B-P'及P-B')，所以它是稳定的。因此，只有当 $int$ 蛋白单独存在时，插入得以完成，而当 $int$ 及 $xis$ 两蛋白皆存在时发生的是切除。

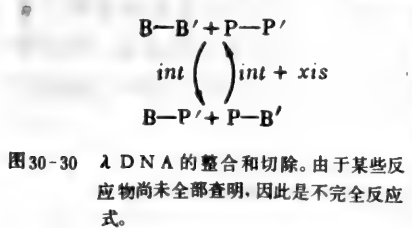


图30-30 λDNA的整合和切除。由于某些反应尚未全部查明，因此是不完全反应式。

### 反转病毒及若干DNA病毒可在易感宿主中诱发肿瘤

1911年，劳斯，P. (Peyton Rous) 制备了一个自发出现的母鸡结缔组织肿瘤的无细胞滤液，将之注入正常雏鸡。惊异的结果是受者都罹患了同种强恶性肿瘤——肉瘤。劳斯还发现滤液中的致癌剂——现称为劳氏肉瘤病毒(RSV)或鸟类肉瘤病毒(ASV)(图30-31)

可以通过在雏鸡中连续接种而传代。鸟类肉瘤病毒是**RNA肿瘤病毒**(致癌RNA病毒)类的一员。这类病毒在其病毒粒子中含(+)RNA,并通过双螺旋DNA中间物而传代,故此又被称为**反转病毒**。实际上,反转病毒是唯一能产生肿瘤的RNA病毒。恶性肿瘤还可被多种DNA病毒所诱发。**猿病毒40(SV40)**及**多瘤病毒**皆属乳多空病毒类,是研究得最多的**致癌DNA病毒**(图30-32)。人们对这些RNA和DNA病毒有很大兴趣,因为它们只含4

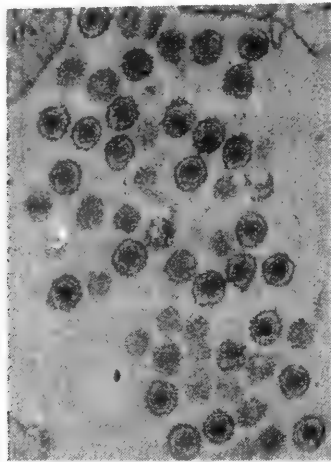


图30-31 反转病毒的一种——鸟类肉瘤病毒(Rous肉瘤病毒)的电镜图。染色深的病毒粒子处于感染雏鸡细胞的表面。  
[蒙Dr. Samuel Dales特许。]

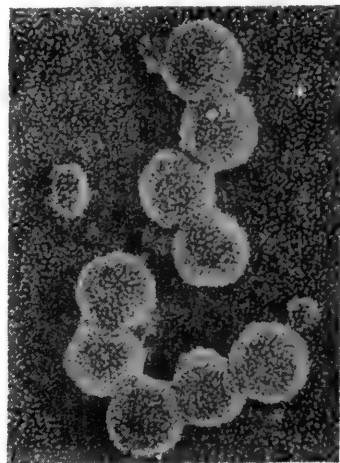


图30-32 DNA肿瘤病毒之一——SV40的电镜图。[蒙Dr. Jack Griffith特许。]

或5个基因。而只有一或两个病毒基因是与致癌直接有关的,因此研究者希望能揭示它们的作用方式。

为了从分子水平来研究肿瘤,人们建立了组织培养系统。将致癌病毒注入适当的动物细胞中,就可使细胞永久性的**转化**——成为类肿瘤态。转化细胞与正常细胞在生长方式和细胞表面本质方面都有不同(表30-3)。最显著的变化是转化细胞的生长是不断的和杂乱的,对其邻近细胞毫无顾及。还有,转化细胞含有**整合到宿主基因组中去的病毒特异DNA**,因此转化是一可遗传的变化。转化细胞的这些异常特点在培养细胞集落中得到连续。此外,当将足够量的组织培养转化细胞注入合适宿主体内时,有些可成长为肿瘤。

表30-3 DNA或RNA肿瘤病毒诱发的转化细胞的异常性质

<b>生长方式</b> 注入敏感动物体内能形成肿瘤 高密度生长 无规律生长,细胞与基层脱离 蛋白酶激活剂分泌入培养液使细胞更富侵袭性 对血清因子的需要降低	<b>表面性质</b> 神经节苷脂含量降低 胚原性抗原暴露 营养物质输送速率增加 对植物凝集素的凝集作用增强
<b>表面性质</b> 出现新的病毒特异抗原 一种外表面蛋白质,即纤维结合素消失	<b>肿瘤病毒存在的标志</b> 病毒DNA顺序存在 病毒mRNA存在 病毒特异抗原可检出

引自J. Tooze, ed. *The Molecular Biology of Tumour Viruses*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1973), p. 351.

# SV40和多瘤病毒生产性地感染或转化宿主细胞

SV40及多瘤病毒是在二十面体壳罩内含小环形DNA双螺旋。在某些细胞（称许可性宿主）内，这些病毒经历溶解循环途径，其结果是产生许多新病毒粒子（图30-33）。细胞被病毒生产性地感染而杀灭。在其它类型的细胞（称为非许可性宿主）中，病毒表达的某些步骤原因不明地受到阻塞，子代病毒不形成，但少量的细胞，约 $1/10^5$ ，在病毒DNA整合到宿主基因组后被转化。

已经阐明SV40 DNA整个5,243碱基对顺序，对其复制和转录的不少方面也有了解。DNA的一半在感染早期就被转录，另一半则在感染的后期，病毒DNA合成的同时，才被转录（图30-34）。事实上，DNA复制的起始原点与早期区和晚期区的起始点相对应。早期区为T抗原

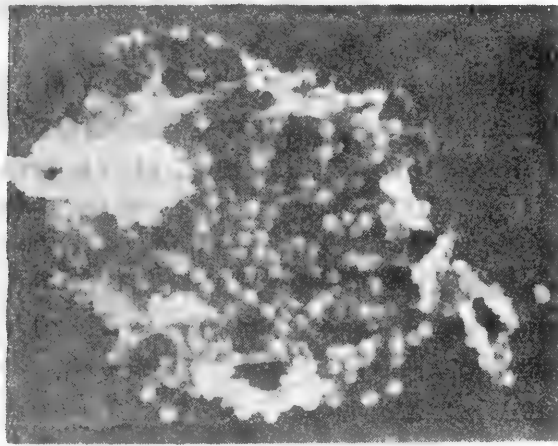


图30-33 SV40感染细胞的核膜碎片电镜图。示核膜孔及许多嵌进的病毒粒子。[蒙Dr. Jack Griffith特许。]

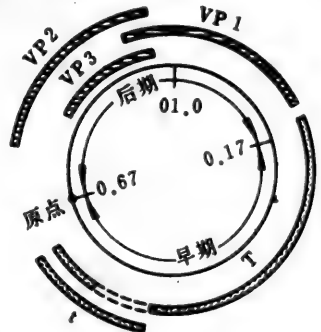
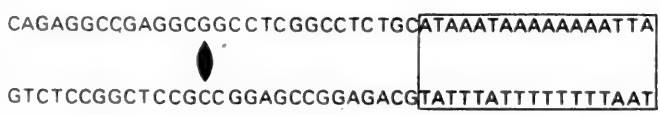


图30-34 SV40（含5,243碱基对）的遗传图。早期区（反时针向转录）以黑色点表示，晚期区（顺时针向转录）以斜线表示。

原（A蛋白）编码，沿反时针方向转录。T抗原是起始DNA复制的必需蛋白质。另一个在免疫学性质上完全不同的蛋白质，小t抗原，也由早期区编码。在合成T抗原的mRNA时，初级转录本中一个插入顺序被切除。于是SV40利用细胞核中的拼接工具。复制原点的碱基顺序也值得注意。它有两段由二重对称轴相互关联的13-碱基对序列，并紧连于一富含AT的顺序旁：



T抗原就结合于此位点。

晚区的转录是由复制原点起沿顺时针方向进行（图30-34），导致三种衣壳蛋白质VP，VP2和VP3的合成。同样也须先由初级转录本中切除插入顺序。可能是通过不同的拼接反应形成了三种mRNA。VP3的氨基酸顺序与VP2顺序的羧基末端的70%交搭。此外，VP2

乳多空病毒（papovavirus）——是按其三个原型命名的一组DNA病毒，三个原型为papilloma乳头瘤，polyoma多瘤和vacuolating成空泡（SV40）病毒。

及V P 3的读码和V P 1的另一读码有22个核苷酸是交搭的。因此 SV 40虽只含有限的遗传信息，但却得到充分利用。遗传节约的另一例是 SV 40并不合成包装其DNA的蛋白质，而是

表30-4 SV 40编码的蛋白质

蛋 白 质	质量 (kda1)	m R N A	作 用
T 抗原 (A 蛋白)	94	早期	为DNA 复制的起始及转化所必需
t 抗原	21	早期	未知
V P 1	40	晚期	主要衣壳蛋白质
V P 2	39	晚期	次要衣壳蛋白质
V P 3	27	晚期	次要衣壳蛋白质

用宿主细胞的组蛋白与新生DNA 结合(图30-35)。此超螺旋状复合体然后由VP1 及VP2 及V P 3包罩起来。最后，子代病毒粒子由溶解的宿主细胞释放出来，在此过程中细胞也就被杀灭。

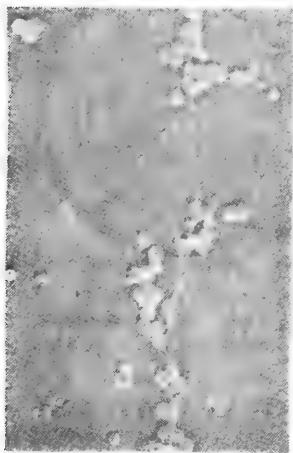


图30-35 SV 40 肿瘤病毒颗粒与宿主染色体附着生长的电镜图。  
[蒙Dr.Jack Griffith 特许。]

在非许可性细胞中，SV 40的早期区能表达，但不发生DNA 复制及晚期区转录。这些细胞中一小部分通过SV 40基因组与宿主DNA 的整合，成为转化细胞。但SV 40 DNA 的整合作用与λ 噬菌体DNA 的整合不同，似不涉及病毒或宿主DNA上的特异位点。T 及t 这两种病毒抗原都是转化过程所必需，并可能和维持转化状态有关。将转化细胞注入易感动物引致肿瘤迅速出现。当前SV 40研究的一个主要目标是探讨整合状态病毒的早期区的表达是如何使细胞癌化的。

反转病毒含有从(+)RNA合成  
双螺旋DNA的反转录酶

另一类致癌病毒是反转病毒，它含有(+)RNA基因组，外罩以二十面体壳。这一球形核蛋白核心外周包有被膜，后者由从宿主细胞质膜获得的、嵌着由病毒编码的糖蛋白分子的一类脂双层构成。反转病毒的直径典型的为1000Å（见图30-31）。

1964年，特明，H. (Howard Temin) 观察到，RNA 肿瘤病毒，如鸟类肉瘤病毒，引致的感染可被DNA 合成抑制剂所阻止。氮甲喋呤、5-氟脱氧尿苷和胞嘧啶阿拉伯糖苷等抑制剂如果在引入病毒后十二小时内存在的话，能有效地阻挠感染。这一发现提示，DNA合成对RNA肿瘤病毒的生长是必要的。另外，子代病毒粒子的产生还被放线菌素D所抑制。已知此抗菌素抑制以DNA为模板的RNA合成（478页）。因此，DNA的转录似也是RNA肿瘤病毒增殖所必需。这些未能预料的结果启示特明作如下建议：在RNA肿瘤病毒的复制和致癌作用中存在一个DNA前病毒中间物。

RNA肿瘤病毒→DNA前病毒→RNA肿瘤病毒

对特明这一大胆假定——遗传信息可由RNA流向DNA，开始时多数研究人员并无热情。因为

这假说需要有一个当时未知的酶能按RNA模板的指令进行DNA的合成( **RNA指导的DNA聚合酶** )的存在。1970年,特明及巴尔蒂莫尔( Baltimore )分别独立地在一些RNA肿瘤病毒粒子中发现了这样一种酶,现称为 **反转录酶** 。在以后研究的所有RNA肿瘤病毒中,都有反转录酶存在,因此这些病毒现在被称为 **反转病毒** 。

当感染的病毒粒子与宿主表面特异受体结合而进入细胞时,一个典型的反转病毒的生活史就开始了。在胞浆中,病毒(+)RNA被除去外壳。由病毒粒子带入的反转录酶即行合成(-)DNA链。此酶进而对RNA-DNA杂交体中的基因组RNA链起消化作用。此(-)DNA

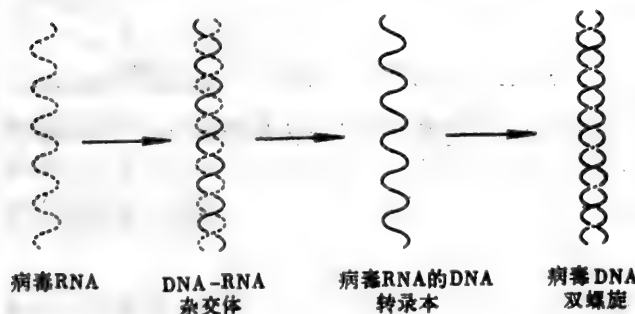


图30-36 反转录酶按RNA模板合成DNA。引物未示出。

链然后指导反转录酶合成(+)DNA链。于是,反转录酶执行了一连串的三个反应: **RNA指导的DNA合成, RNA水解以及DNA指导的DNA合成** (图30-36)。

反转录酶与其它DNA聚合酶一样,由5'→3'方向进行DNA合成,而且也不能开始链的新合成。那么病毒DNA合成如何始引? 现知起始作用能颇经济地实现:

(+)RNA病毒基因组包括一个在前轮感染中由宿主中获得的、非共价结合的转移RNA(如鸟类肉瘤病毒trp tRNA)。此碱基配对的tRNA的3'OH端就作为DNA合成的引物。整个(+)RNA链又是怎样复制的? 请回忆,在任何线形DNA复制中皆遇到一特殊困难( 570 页)。反转病毒以一巧妙的方式对付了这一挑战。它们的基因组不是只含一个而是含有两分子(+)RNA(图30-37)。这些分子在其近5'端处以氢键相互结合。此外,(+)RNA在其5'及3'端含有相同顺序。这种末端重复性可能如在T4噬菌体中那样对复制过程是必需的( 571 页)。

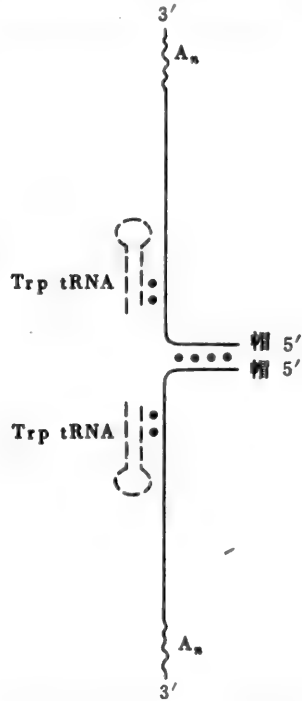


图30-37 鸟类肉瘤病毒基因组示意图。完全相同的两个(+)RNA分子以非共价方式结合。5'端有帽,3'端有多聚A尾。作为引物的tRNA分子各与一个RNA分子碱基配对。

### 反转病毒DNA只在整合进入宿主基因组时才得到转录

病毒DNA双体变成环状并进入核内。反转病毒DNA的转录只有当其整合进入宿主细胞DNA时才发生。因此整合是反转病毒生活史中的一个必要步骤。相反,在致癌

DNA病毒中整合和生产性繁殖感染是可选其一的途径。另一差别是由于整合在生产性感染中的中心地位，反转病毒DNA整合的频率很高，这也是可料到的。

鸟类肉瘤病毒的10-kb基因组含有四个基因（图30-38）。其中三个——*gag*、*pol*和*env*对生产性感染是必要的。*gag*基因为76kdal的多聚蛋白质编码，此多聚蛋白质裂解以后，形成病毒核心的四个蛋白质。*pol*为反转录酶编码，此酶由一个 $\alpha$ 及一个 $\beta$ 亚基组成。65kdal的 $\alpha$ 亚基是90kdal $\beta$ 链的一个蛋白水解片段。*env*为病毒被膜上的糖蛋白编码，此糖蛋白对病毒在宿主表面附着的过程有重要作用。第四个基因*src*（取自sarcoma，肉瘤一词）与病毒繁殖无关，但为转化所必需，将在下面讨论。

各种不同的病毒mRNA可能都是从10kb的初级转录本拼接得来，然后它们被输入胞液，在那里进行翻译。基因组RNA和病毒蛋白质再移行至质膜并掺入其中。一部分累及的质膜可以生出芽状突起以形成一个新病毒粒子。这样，反转病毒的繁殖性感染与致癌DNA病毒不同，是非溶解式的。反转病毒一般不杀灭宿主。反转病毒DNA存留在感染细胞的基因组中继续得到表达。并且，整合的病毒DNA与宿主DNA一起复制，因此，病毒基因组可遗传给子代细胞。

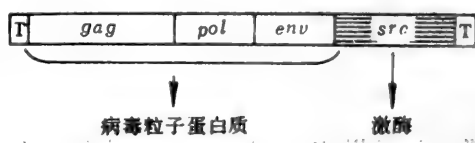
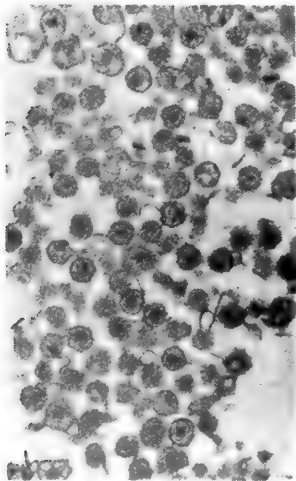


图30-38 鸟类肉瘤病毒的遗传图。基因组长10kb。T表示末端的多重性顺序。

### 鸟类肉瘤病毒*src*基因编码的激酶是转化作用的介导体

通过研究某些温度敏感性的突变种，对鸟类肉瘤病毒转化作用的机制有了一些了解。在高温时，这些变种能正常地增殖但不能引起宿主的转化，而在低温时两个过程都正常进行。此外，被这类变种在低温下转化的成纤维细胞，当提高温度时又复原成正常细胞。确实，转化与正常状态间的互变是完全可逆的。对这些变种的分析指出，与此有关的只是一个病毒蛋白质，它是*src*基因的产物。所谓*src*基因，就是因为它能指导导致肉瘤蛋白的合成。值得注意的是这些变种的病毒DNA在高温时，保持与宿主基因组的整合状态。因此，单纯整合并不能导致转化，必须还要有*src*基因的表达。



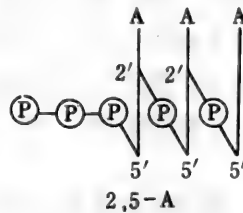
*src*基因产物的本质如何？近日的研究指出此60kdal蛋白质是一促使蛋白质磷酸化的激酶。目前正在研究激酶的靶标以期阐明转化途径。单独一个小蛋白质居然能深刻地改变细胞的生长特点并使之癌化，确是令人瞩目的事。

图30-39 鸟类骨髓母细胞瘤病毒颗粒电镜图。将此RNA肿瘤病毒注入初生小鸡中，即在三周内产生一种致命的白血病。〔蒙Dr. Ursula Heine, National Cancer Institute特许。〕

## 双链RNA抑制经干扰素处理的细胞中的蛋白质合成

动物细胞对多种病毒的抵抗力可被干扰素（一类小蛋白质）大大加强。脊椎动物细胞，在受病毒感染后能合成并分泌干扰素。双链DNA在刺激干扰素形成上特别有效。在机体中干扰素能结合在其它细胞质膜上，并导致抗病毒态的形成。这些细胞获得对宽谱病毒的抵抗力。与此不同，抗体引致的免疫性是极为专一的。干扰素作用很强，只需 $10^{-11}$ M就有显著的抗病毒效用。

干扰素使三种酶的产生加强，由而导致抗病毒态。这三种酶是：一种寡核苷酸合成酶，一种核酸内切酶及一种激酶。这三种酶平时处静止状，而在易感细胞被病毒感染或经双链RNA作用后才活化。这些酶活化后通过两条不同道路以阻断蛋白质的合成（图30-40）。蛋白激酶将蛋白质合成过程中所需的起始因子磷酸化，致使其活性丧失。我们知道此起始因子在网织细胞中的级联调节机制中也是一个靶标（556页）。双链RNA对干扰素致敏细胞的另一主要



（核酸内切酶激活剂）

作用是刺激mRNA的降解。一种核酸内切酶，被称为2.5A的寡聚腺苷酸激活，双链RNA能刺激催化形成这种核酸内切酶激活剂的合成酶。这些代谢途径除作为针对病毒的防卫措施外，是否对未感染细胞亦有调节作用，是很有意思的问题。

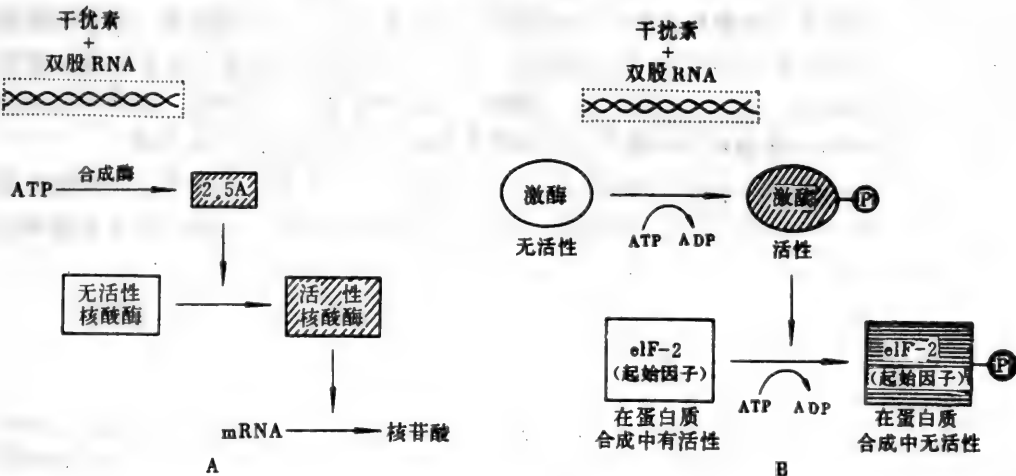


图30-40 在干扰素处理的细胞中，双链RNA (A) 刺激 mRNA 降解和 (B) 抑制蛋白质合成的起始。[依据 P.J. Farrell, G.C. Sen, M.F. Dubois, L.R. Ratner, E. Slaterry, and P. Lengyel, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75 (1978): 5896.]



病毒是罩有保护性外壳的感染性核酸的小包装。它们或含有DNA或含有RNA,可以是单链的,也可以是双链的。最简单的病毒只具三个基因,而最复杂的可有250个基因。由于病毒只含很少量的遗传信息,所以多数病毒的外壳含有大量的一种或几种蛋白质亚基。病毒有两种主要的结构形式:具螺旋对称性的圆柱状外形及有二十面体对称性的球状外形。烟草花叶病毒的组成是单链RNA分子外面螺旋式地绕有2,130个相同的亚基;其自我装配是蛋白质盘加到RNA环上去的过程。番茄丛缩病毒能形成二十面体外壳,因为它的壳蛋白质的结构域是绞链性的。T<sub>4</sub>噬菌体的装配过程复杂得多,其中牵涉到约五十个蛋白质。有三条不同的主要途径,它们分别独立地形成头部,尾及尾纤维。在T<sub>4</sub>形成中步骤的次序性非常严格,通过自我装配和酶促装配两过程的结合才能完成。在T<sub>4</sub>装配中支架蛋白质亦很重要。

未感染细胞不能依照RNA模板进行RNA合成。因此,RNA病毒(RNA肿瘤病毒除外)的一个共同特点是它们规定一个RNA指导的RNA聚合酶。在某些RNA病毒(如Q $\beta$ 噬菌体)的病毒粒子中,RNA就是感染的信使。在另外一些RNA病毒(例呼肠孤病毒)中,基因组RNA在感染后须先转录。这由病毒粒子中带进的一种酶来完成。RNA病毒合成蛋白质时采用各种不同战略。脊髓灰质炎病毒蛋白质是由巨型蛋白质前体裂解生成,呼肠孤病毒为其合成的每个蛋白质备有不同染色体,而滤泡性口炎病毒则由一单一的基因组RNA转录出数个单顺反子mRNA来。

并非所有病毒都将其宿主毁灭。温和性噬菌体 $\lambda$ 以一种潜伏状的前噬菌体形式存在,这时它的DNA通过相互重组被整合进入细菌染色体中。这种前噬菌体保持着繁殖和溶解能力,当前噬菌体从宿主DNA上剪切下来后就表现出这种能力。同样,DNA肿瘤病毒SV40和多瘤病毒可以繁殖并溶解它们的宿主,或者可将其DNA整合于宿主细胞DNA中。反转病毒只能通过整合于宿主细胞DNA中而繁殖后代。它们含有能按基因组RNA合成DNA双体的反转录酶。反转病毒的繁殖性感染与致癌DNA病毒相反,不通过溶解。在其基因组中含有SV40,多瘤病毒或反转病毒DNA的细胞,它们的生长类型和细胞表面皆异常,并在注入易感动物后能致肿瘤。在研究肿瘤的分子基础中此类病毒是诱人的模型,因为它们只含约五个基因。由鸟类肉瘤病毒的src基因编码的一个激酶似乎与细胞转化有关联。

干扰素能使动物细胞对多种病毒的抵抗力大为提高,干扰素是当细胞受病毒感染后合成并分泌的一种蛋白质。它能加强三种酶的产生,这三种酶通过抑制一个起始因子和降解mRNA而阻止蛋白质合成。

---

“生物学研究象是天然美学中的一种练习。作为生物学家,我们不断地领悟到由选择保持的进化进程是多么经济,充满着优美和智慧,使人从中获得极大乐趣。病毒学家又是最幸运的生物学家之一,因为他们已能透视宠爱的对象到最微观的分子细节。根据一些最基本的生物行为,病毒学家可以了解这种极限寄生物是怎样发挥功能的…”

戴维·巴尔蒂莫尔

(David Baltimore)

诺贝尔奖金演讲(1976)

© 诺贝尔基金会, 1976





图31-1 遗传信息由一个大肠杆菌细胞传至另一大肠杆菌细胞。电镜图示两个大肠杆菌在交换时由一个纤毛联接起来。供体DNA经纤毛传送给受体细胞。[蒙Dr.Charles Brinton and Dr.Judith Carnahan特许。]

## 第31章 基因重排：重组、移位和克隆

本章的主题是：通过大段DNA的移动使新的基因排列形成。首先考虑的是**基因的重组**，在此过程中DNA链经破裂和重合后形成了新的DNA分子。相互作用的DNA分子间若有

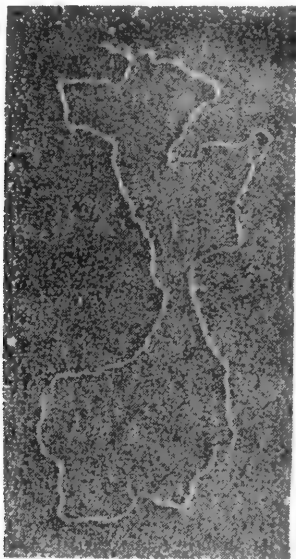


图31-2 含有对几种抗菌素具抗药性基因的环状DNA分子的电镜图。传染性的抗药性是这种R（抗性）因子质粒传播的结果。[蒙Dr. Stanley Cohen 特许。]

广泛的顺序同源性存在就可显著加强基因重组。已分离得到重组的中间物，最近，一个催化DNA链互换的酶也已得到鉴别。其次我们将考虑**移位**，即一个基因从一染色体迁移到另一染色体，或者在同一染色体的一个位点迁移到另一位点的过程。移位与一般重组不同，它不需要广泛的顺序同源性。在原核细胞中，移动性来源于**插入顺序**，它使无关的DNA片段连接起来。重组与移位通过产生新的基因组对进化起了重要的作用。本章的最后部分讨论在实验室内建造新的基因组合以及它们在宿主细胞内表达。运用限制性内切核酸酶及DNA连接酶可将基因共价地插入质粒及病毒的DNA中去。这些**重组的DNA分子**在适宜的宿主细胞内可以复制与表达。亦将讨论基因无性繁殖（克隆）的价值及其将产生的冲击。重组、移位和克隆研究的步伐极为迅猛。这些研究为基因组的分析提供了有力的新方法，并正不断地对更深入地了解它们的进化与表达作出贡献。

### 基因重组经过DNA链的断裂及连接

基因重组时形成了一个DNA分子，其碱基序列部分来自一个亲代的DNA分子，部分来自另一亲代DNA分子。以 $^{32}\text{P}$ 及溴尿嘧啶标记的T4噬菌体感染大肠杆菌，用这种杆菌进行的研究，为观察重组分子的分子性质提供了资料。溴尿嘧啶标记DNA的浮力密度显著高于 $^{32}\text{P}$ 标记的DNA，所以亲代DNA分子能通过氯化铯梯度离心而相互分离并也与重组物分离开来。对这些梯度离心产物的分析表明，在用这种混合噬菌体感染后，形成了含有 $^{32}\text{P}$ 及溴尿嘧啶的重组DNA分子。这些杂交物的性质与它们形成时是否发生DNA合成有关。在无DNA合成时，重组物中的 $^{32}\text{P}$ -DNA不与溴尿嘧啶DNA以共价连接。将此杂交物加热到双链的解链温度以上时，它可被解离为一重一轻二个组份。杂交物中的亲代单位是由碱基配对拉在一起，因此这中间物称为搭连物（图31-3）。但是，有DNA合成发生时，这搭连物中的缺口由DNA聚合酶I填满，其末端则由DNA连接酶封闭起来。这样形成的重组分子

因DNA片段已共价连接，就不能再被分为轻链与重链。这些实验说明，DNA单链区是基因重组的中间物，并提示酶与此过程密切相关。

### 基因重组时同源DNA链配对形成双链的中间物

曾用电镜观察到基因重组的中间物。在这一研究中，选用的DNA分子是大肠杆菌的质粒。下面即将讨论到（591页）这些小的环状DNA双链在菌体内可自动地复制。在氯霉素存在的条件下，一个细菌体内的质粒数可从20左右增加到1000。这种作为蛋白质合成抑制剂的抗菌素可阻止细菌染色体的复制但并不抑制质粒的复制，因此细菌细胞内充满了可重组的质粒分子。从这些细胞中分离出来的质粒经电镜检查出约有1/4是具8字形的二聚体（图31-4A）。这些二聚体然后被限制性核酸内切酶EcoR1裂解，后者将单体质粒在唯一的位点上切开。假使这二聚体是交锁在一起的单体或二倍长度的环，则这一过程将产生单位长度的短棒状物。另一方面，如果二个质粒的环是以共价在同源的一点上连接，则将形成带有四个臂、类似希腊字母X的结构。事实上，几乎所有8字形都转变为X形（图31-4B）。这雄辩地提示8字形式是重组的中间物。这个推论在某些缺乏重组能力的大肠杆菌突变株中得到支持，发现它们不形成8字。

在8字形式中二个基因组的交换区的本质如何？X形式中的联系点总是把结构分为等长的臂对。这意味着基因组是在同源性的区域连接（图31-5）。假使质粒是在无关序列处连接，则

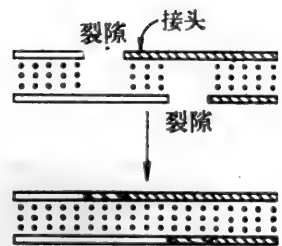


图31-3 在感染细菌中，T4 DNA重组形成的搭连中间物。<sup>32</sup>P标记的DNA以斜线表示，溴尿嘧啶标记的DNA以空白表示。

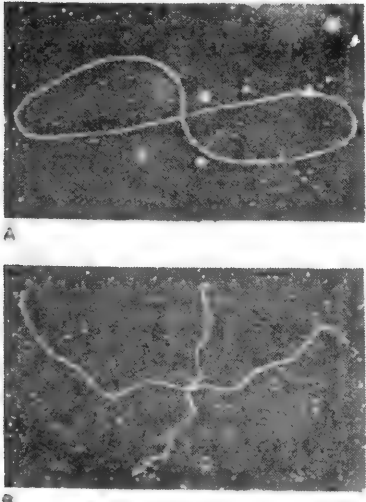


图31-4 正在重组时的DNA分子电镜图。  
(A) 8字中间物含有二个DNA分子。  
(B) 通过限制性核酸内切酶裂解产生的X形式。[引自H. Potter and D. Dressler, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76 (1979) : 1086.]

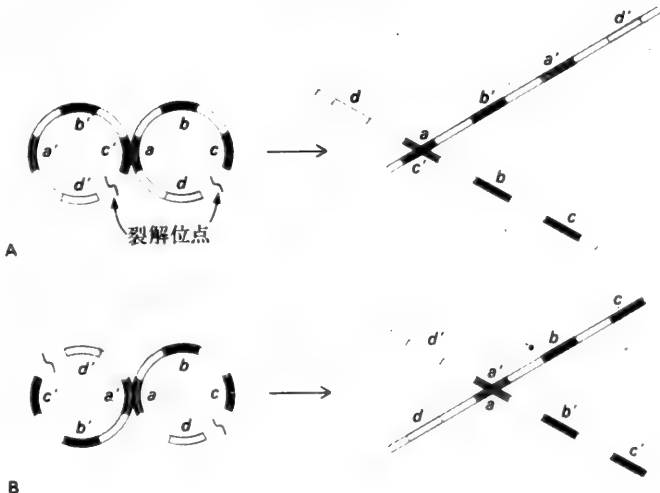


图31-5 预计的裂解方式。当二个DNA分子连接在(A)非同源位点，(B)同源位点。观察到的对称X形（如在图31-4B中）表明8字式的DNA分子是在同源位点上连接。

4个臂的长短将无特殊关系。此外，沿着整个质粒联系点发生的机率几乎是同等的，这表明配对可在许多位点出现。对交换区的链连接情况曾用选择性变性法作了观察。电镜显示自二个基因组的接合点上，有四个双链从相互连接的单链环中延伸出来（图31-6）。随后，这个中间物可被裂解及连接以产生二套不同的重组分子（图31-7）。

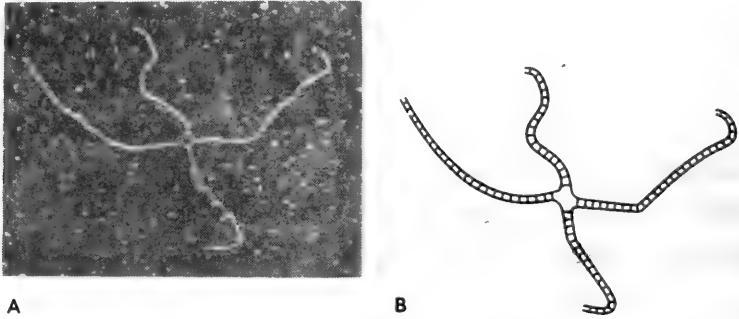


图31-6 A, X形的电镜图。B, 解释图。用甲酰胺将同源区（富含AT碱基对）选择性变性以显示交换区链的连接状态。  
[引自H. Potter and D. Dressler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43 (1979) : 973.]

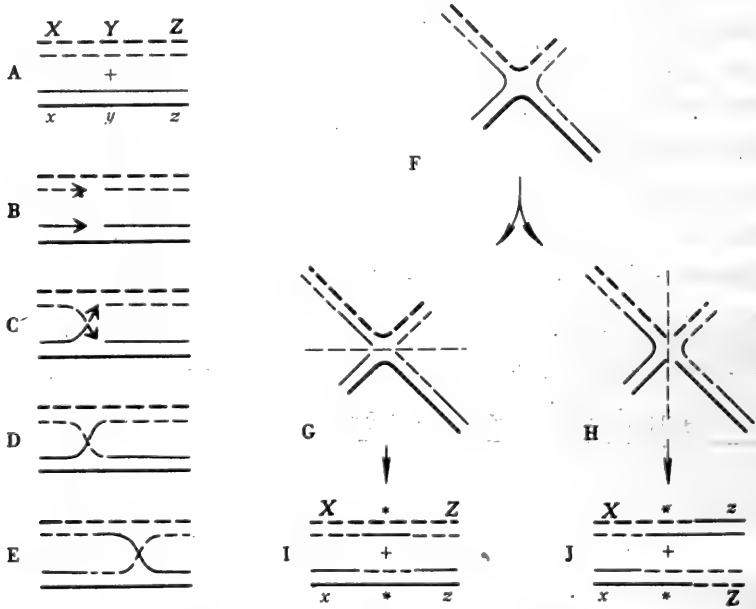


图31-7 霍利德, R. (Robin Holliday) 提出的基因重组的模式。一条亲代的双链以虚线表示, 而另一条为实线。每条双链中较深的链是(+)链。X、Y及Z代表三个基因; x、y及z是等位基因。在C及D部分, 亲代DNA分子以共价形式连接。F部分是E部分的另外一种表示形式。注意F部分可沿水平轴或垂直轴裂解。在G及H部分, 链的再连接得到二组不同的重组物(I及J)。由来自亲代双链中的一条单链组成的区域用星号标出。[依据H. Potter and D. Dressler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43 (1979) : 973.]

### 基因重组时recA蛋白催化ATP驱动的DNA链的交换

到此为止讨论的过程称为普通遗传重组, 因为在亲代DNA分子上的任意一对同源序列

间皆能发生交换。在大肠杆菌中，普通重组依赖rec基因。在rec<sup>-</sup>的细胞中，细菌的DNA不能与外源的DNA分子重组。曾鉴别了三种rec基因：recA，recB及recC。recB蛋白（140kda1）及recC蛋白（128kda1）是核酸酶的二个亚基，此酶可将双螺旋DNA解链并先后将二链水解为片段。这些含有几百个核苷酸的片段进一步被也具有外切核酸酶活性的recBC酶所消化。这个复合酶的解链及核酸水解活性与ATP的水解有关。recBC蛋白在重组中的作用可能是产生单链DNA，后者能再攻击双链DNA分子。

单链DNA怎样在一个双链中找到一个同源序列，与其互补链配对并取代另一条链？最近证实recA蛋白（40kda1）能催化这个链同化反应，它需ATP的水解加以驱动。这个反应的产物包括一双链及一被置换的单链环，它具有似字母D的形状，所以称为D-环结构（图31-8）。D环的形成可由特异结合在单链DNA上的一种蛋白而加强。单链DNA结合蛋白在DNA复制时亦重要（455页），它使由recBC核酸酶所形成的单链DNA稳定，并刺激由recA催化的链同化反应以形成同源双链。

细菌含有质粒及其他流动性遗传元件

普通遗传重组产生新的特异的等位基因的组合，但对全部基因座位的排列并不轻易更改。换句话说，ABC'D'E'能容易地由同源的ABCDE及A'B'C'D'E'重组而形成，但不能形成ABXYZCDE及ABE。这些大规模的基因重排可由流动性遗传元件介导，它们亦称为易位元件（表31-1）。质粒是一类重要的流动性遗传元件。它们是环状双链DNA分子（图31-9），大

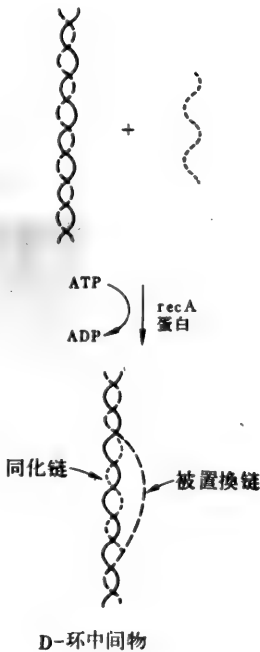


图31-8 由recA蛋白所催化的一单链DNA分子(虚点表示)与双链的互补链(实线表示)的配对。产生的结构称为D环。

表31-1 大肠杆菌流动的遗传元件

类 型	大 小 (千碱基)	特 性
质粒		
F (致育) 因子	93	表现雄性; 通过接合传播。
F' 因子	>100	携带除F因子基因以外的大肠杆菌基因。
R (抗性) 因子	4—117	携带抗药性基因, 有些亦携带接合基因。
大肠杆菌素产生因子	6—141	携带产生大肠杆菌素(毒素)基因。有些亦携带接合基因。
溶原性噬菌体		
λ	48	少数除携带病毒基因外又带大肠杆菌基因(gal或bio)。
μ	38	所有μ皆携带大肠杆菌基因组的一小片段。
插入顺序 (IS)	0.8—1.4	侧翼有一对IS的基因在细胞内可移位。

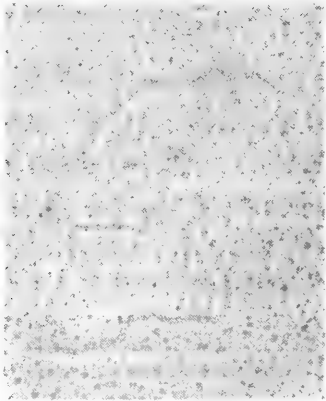


图31-9 一种小的R-因子质粒电镜图。  
[蒙Dr. Jack Griffith 特许。]

小范围为2至数百个千碱基。质粒带有使抗菌素失活的基因，天然产物的代谢基因以及产生毒素等基因。实际上，质粒是副染色体。它们与细菌的染色体不同，在某些条件下是非必需的。

此外，质粒能不依赖宿主染色体而自主复制。一个大肠杆菌细胞典型地约含有20个较小染色体的拷贝和1—2个较大染色体的拷贝。

### F 因子通过接合作用使细菌将基因供给受体

某些质粒通过形成细胞-细胞间直接接触使细菌将遗传物质互相转移。这个过程称为接合作用，是1946年由里德伯格，J. (Joshua Lederberg) 及塔特姆，E. (Edward Tatum) 发现。

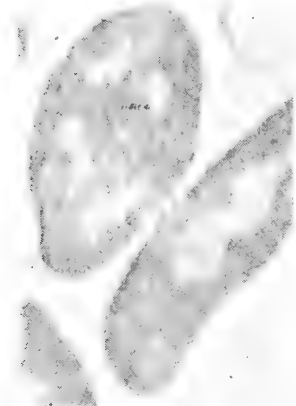


图31-10 当接合时，二个接触着的大肠杆菌的电镜图。[蒙Dr. Lucien Caro 特许。]

当大肠杆菌接合时，一个配偶体（雄的）是遗传供体而另一个（雌性）是遗传受体。雄性细菌在它们的表面含有特别的称为性纤毛的附属物，而雌性细胞含有结合纤毛的受体部位。雄性及雌性细胞通过纤毛而连接（见图31-1），纤毛回缩使细胞建立直接接触使DNA得以通过（图31-10）。雄性细菌含有一个叫做F因子（致育因子）的质粒，它含有形成性纤毛及接合时需要的其它成分的基因。在接合时F因子质粒的一链被折断，同时双链解链（图31-11）。断链的5'端进入受体细胞并合成互补链以形成一封闭的环状双链。受体细胞中（原来F<sup>-</sup>）F因子质粒的出现使它转变为雄性（F<sup>+</sup>）。一个雄性细胞可以自发地失去F因子由此转回成F<sup>-</sup>。

F因子质粒可整合到细菌的染色体中去。整合作用的发生是通过在细菌染色体上许多位点之一处进行的交换。整合的频率约为每代10<sup>-5</sup>。在其染色体中怀有F因子的细菌称为

**Hfr** 细胞，因为它们表现高频率的重组作用。Hfr细胞，类似F<sup>+</sup>细胞，是接合时的供体（见图31-12）。它们之间的差别是Hfr细胞给出全部细菌的染色体（包括整合的F因子），而F<sup>+</sup>细胞

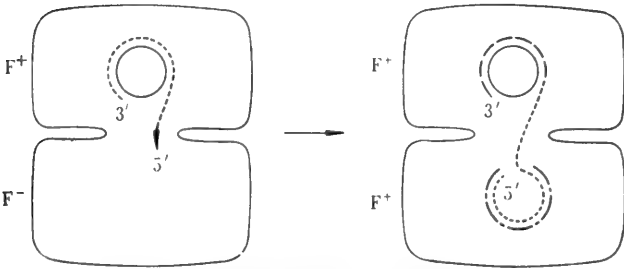


图31-11 接合时链的转移的假设模式图。F<sup>+</sup>供体的超螺旋R因子在形成缺口后解链。R因子的一条链被转移给F<sup>-</sup>受体的同时伴随有供体链的复制。然后在受体细胞内合成一条互补链。[引自G. J. Warren, A. J. Twigg, and D. J. Sherratt, *Nature* 274 (1978): 260.]

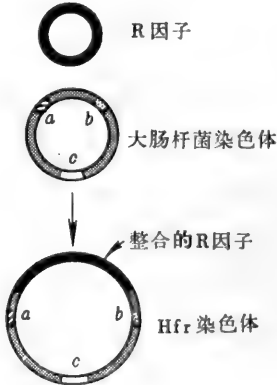


图31-12 F因子整合到大肠杆菌的染色体中后形成Hfr细胞的图解。

仅提供F因子。在Hfr与F<sup>-</sup>交换时，整个染色体的转移约需90分钟。供体基因进入受体的次序与F因子整合的位点及它的极性有关。因此，利用在不同时间中断接合并测定哪些标记物

已被转移的方法，以确定供体染色体的基因次序是可行的。供体的染色体能与受体的染色体重组。第一个进入受体的基因由于它们存在的时间最长，所以重组的频率最高。因此，通过测定供体献出标记物的进入时间及重组的频率，就可描绘出遗传图谱。

一个Hfr细胞在其染色体上的F因子切除后恢复为F<sup>+</sup>状态。这种F因子整合逆转频率每代亦约为10<sup>-5</sup>。在一小部分逆转物中，交换发生在与原来整合不同的位点，结果形成了一个除含有F因子基因外还有染色体基因的质粒（图31-13）。这种质粒称为F'因子，它主要表示染色体基因的存在。F'细胞与F<sup>-</sup>细胞的接合导致这些染色体基因从供体细胞移向受体细胞，使后者的这些基因成为二倍体。

因此，细菌具有将全部染色体以及成套基因从一个细胞转移到另一细胞的机制。F因子可被认为是一种特别为遗传物质互换而设计的载体。有趣的是溶原性噬菌体亦能介导宿主基因的互换。例如，λ-噬菌体DNA能插入大肠杆菌染色体的*gal*及*bio*基因之间（579页）。切除一般是精确的，但也不全是。大约在1/10<sup>5</sup>病毒粒子中，λDNA或含*gal*操纵子或含*bio*基因。被这种称为λ*gal*或λ*bio*的噬菌体感染后，除了λ基因外，大肠杆菌基因亦被引入。一种叫做φ80的有关噬菌体能插入近*trp*操纵子处，并将*trp*基因从一种感染细胞带到另一细胞。噬菌体μ几乎可插入到大肠杆菌染色体的任何部位，所以总是与一段细菌的染色体同时出现。这些转导噬菌体和F因子一样，都是能提高细菌基因交换的流动性基因元件。转导作用可能起促进细菌进化的作用。

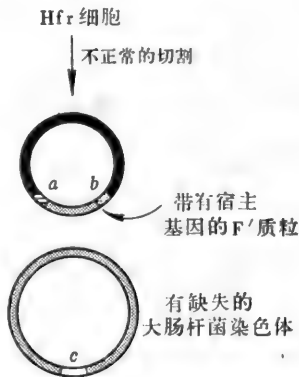


图31-13 不正常的切割导致F'质粒的形成，它含有大肠杆菌的部分染色体。

### R 因子质粒使细菌对抗菌素具抗药性

1955年，当细菌性痢疾流行时发生了一细菌快速进化的惊人事例。志贺氏痢疾杆菌中的一菌株变成对氯霉素、链霉素，对氨基苯磺酰胺及四环素同时都有抗药性的菌株。这种多重抗药性目前普遍地存在于许多致病的微生物中。



图31-14 R因子图解。下半部以黑色表示RTF基因（起接合及复制作用），上部斜线段表示*r*基因（呈抗药性）。上部空白段表示插入顺序。

使对多种抗菌素呈现抗药性的基因连锁存在于R因子（抗药性因子）质粒上。这些质粒中一些较大的质粒则除含有几种*r*基因外还含抗药性转移因子（RTF）（图31-14）。这RTF区域使质粒能经接合作用而被传递到其他细菌。事实上，在RTF区域的基因与F因子中的基因非常类似。*r*基因为酶编码使特异药物失活。带有RTF区域的R因子能于混合培养时在不同细菌品系之间传递，所以，多重抗药性是有感



染性的。

小的 R 因子质粒没有 RTF 区域,常只对一种抗菌素提供抗药性。例如, 8.2kb 的 R-pSC101 质粒携带一种抗四环素基因, 但它不能通过接合作用传递。然而, 这种 *r* 基因可以与另外带有不同抗药基因的质粒连接 (图31-15)。当这些 *r*-基因整合进入含 RTF 区域的质粒后, 就形成一传递性的 R 质粒。所以, 复合 R 因子质粒可由高度流动性的、对不同药物提供抗性的组体构成。这些可移位的遗传元件现在称为易位子。

### 插入元件能使无关基因连接

易位子的高度流动性的结构基础是什么? 电镜及核苷酸顺序的研究说明, 易位子一端的顺序在另一端被重复。例如, 一种为耐氨苄青霉素性编码的易位子  $\alpha 3$  的两个末端含有 38 碱基对的倒转重复顺序。受体的两侧顺序是一个短序列 (典型的为 5 或 9 碱基对) 的非倒转重复, 它在易位子插入以前只出现一次 (图 31-16)。

受体的二侧顺序及易位子的末端顺序间没有同源性。此外, 大肠杆菌的 *rec* 基因并不参与插入过程, 这似与普通遗传重组完全不同。易位子的末端可能通过指导核酸酶以及其它

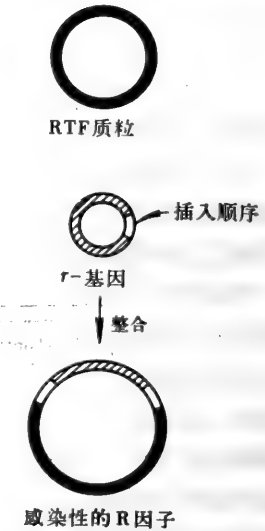


图31-15 当 *r* 基因与 RTF 质粒连接时, 形成有感染性的 R 因子。

与整合有关的蛋白质, 而起一种插入元件的作用。重要的是易位子不需要与受体 DNA 同源, 因为插入的特异性主要是由蛋白质与 DNA 相互作用, 而不是由碱基配对决定。

最小的流动性遗传元件是插入序列 (IS), 它的长度约 1 kb。插入序列与易位子不同, 并不携带任何基因。

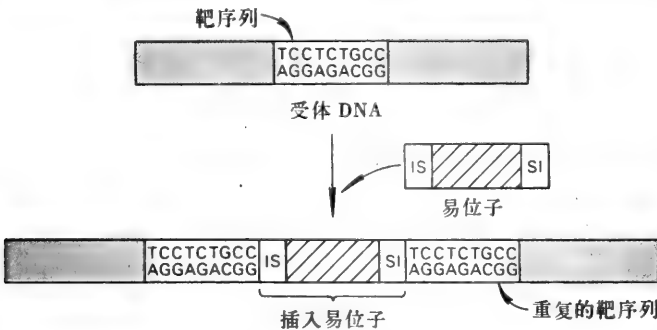


图31-16 由插入序列 (IS) 结合的基因的移位。受体上的靶位点在移位时得到重复。易位子一端的顺序是另一端的倒转重复。

但是, 它们显著地影响附近基因的表达。插入序列通常阻断转录单位远侧基因的转录。他们也能起新起动子的作用。此外, 插入序列可加强诸如缺失及逆位等染色体重排。在大肠杆菌的染色体中找到了四种不同的插入序列 (IS 1, IS 2, IS 3 及 IS 4) 的几个拷贝。再者, 有些易位子的末端顺序与这些插入序列中的一种相同。有可能易位子是在一个基因被一对插入序列包围后形成的。

已经看到质粒和噬菌体能与细菌染色体进行大块基因的互换。质粒和噬菌体亦能相互重组。人们已证实一个四环素抗性元件从 R 因子质粒移向沙门氏菌噬菌体, 然后移到沙门氏菌染色体, 再由此进入  $\lambda$  噬菌体, 而后进入大肠杆菌 *trp* 操纵子, 最后回到  $\lambda$  噬菌体。这种引入



注意的旅行强调了原核细胞基因的高度流动性质。真核细胞中的基因是否亦具高度流动性将是非常有趣的问题。

### 实验室中可建造新的基因组并在宿主细胞中克隆化

近来DNA重组技术的发展是分子生物学中的重大突破。无关基因的新组合已在实验室中建造出来。这些新异的基因组可被再导入适宜的细胞中去，并由宿主细胞的DNA合成机制将其放大许多倍。其中某些插入基因在它们新的环境里也可被转录和翻译。DNA克隆过程的主要步骤是（图31-17）：

1. 一个重组分子的建造 把所要的DNA片段共价地连接在一个DNA载体上。载体的必要特征是它必需能在适当的宿主体内自主复制。例如，质粒及λ噬菌体是首选的在大肠杆菌内进行克隆的载体。如即将讨论到的那样，DNA分子可通过粘性的单链末端片段或钝端片段连接起来的方法而被拼接。

2. 导入宿主细胞 多数细菌及真核细胞可从培养液中摄取裸露的DNA分子。摄取的效率是低的（在 $10^6$  DNA分子中约为1），但在适当的实验条件下约有相当一部分细胞能被转化。或者用另一方法，即用怀有重组DNA分子的重装配的病毒粒子去感染靶细胞。在这种人工合成的病毒基因组中，所需基因取代了一段对复制非必需的病毒DNA。

3. 挑选 下一步是确定那些细胞怀有含所需基因的重组DNA分子。所需要的克隆可根据载体或插入基因本身的存在而选择出来。例如，有些质粒载体表现对抗菌素的抗药性。另一个途径是确定哪些细胞能结合与所需基因互补的RNA，或能合成由它编码的蛋白质。含有重组DNA的克隆至少可稳定几百代。

重组DNA的克隆化已大大加强我们对染色体结构及基因表达的了解。许多插入基因通过克隆而被增殖，由而生产出大量的DNA来作为顺序分析或电镜分析之用。其他本来稀有的蛋白质亦可由这些克隆株大量合成。DNA重组技术亦可用以剖析复杂的基因组及分析它们表达的调节。

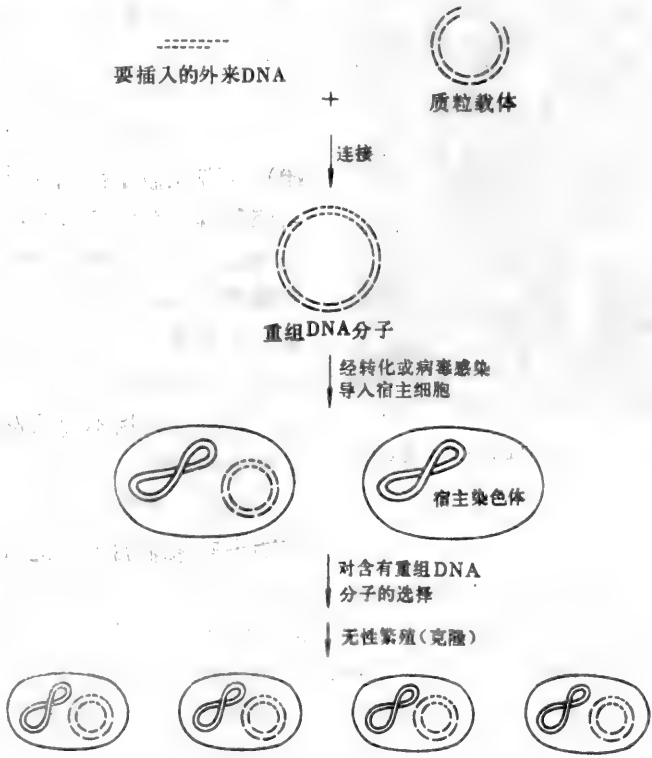
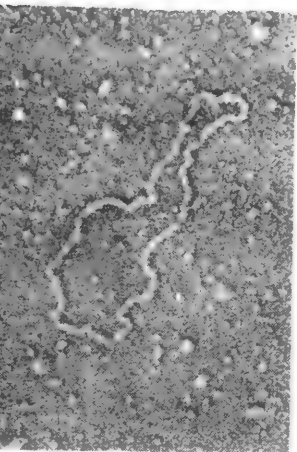


图31-17 重组DNA分子合成及克隆过程。

嵌合DNA——含有无关基因的重组DNA分子。“嵌合”(chimera)来自神话中的一种动物，它具有狮子头、山羊身体及蛇的尾巴。

## 限制性酶及DNA连接酶是形成重组DNA分子的必需工具



18 用作克隆DNA的质粒载体

图31-18 用作克隆DNA的质粒载体  
pSC101的电镜图。[蒙Dr.  
Stanley Cohen特许。]

连接二个无关 DNA 分子的第二种方法是要在一个分子的两个 3' 末端加上多聚 dA 尾, 而在另一分子的两个 3' 末端

加上多聚 dT 尾 (图 31-20)。这种均一多聚物延伸段是由末端脱氧核苷酰转移酶 (末端转移酶) 合成的, 这种酶能将核苷酸加到 DNA 链的 3'-OH 上去。这种转移酶与 DNA 聚合酶不同, 并不接受模板的指令, 所以仅由一种核苷酸组成的尾巴 (典型的为 100 个残基长) 可被加在 DNA 分子上。一个 DNA 分子上的多聚 A 尾就可与另一分子的多聚 T 尾进行退火。这类尾的长度并不精确地规定, 所以二链在 DNA 连接酶连接以前由 DNA 聚合酶 I 补满缺口。

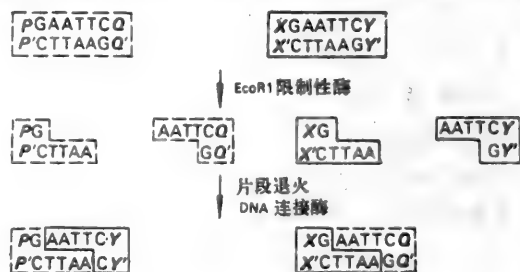


图31-19 粘性末端法连接DNA分子。一个亲代DNA分子带有由限制性位点分开的P及Q基因,另一个带有X及Y基因。一个重组分子含有P及Y,而另一个含有Q及X。

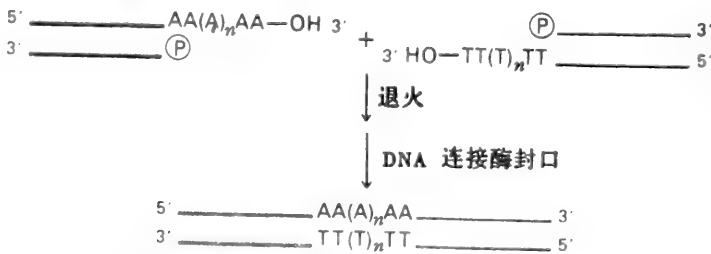


图31-20 多聚dA-多聚dT尾法连接DNA分子。

同样，多聚 dG 及多聚 dC 尾可用以退火不同的 DNA 分子。

第三种连接 DNA 分子的途径是将粘性末端法的优点与 dA-dT 法的普遍适用性结合起来。即将对一种限制性酶裂解敏感的一个化学合成连接剂（6—10 碱基对）共价连结在 DNA 片段或载体的末端。方法是十聚体连接剂及 DNA 分子的 5' 末端先经多核苷酸激酶磷酸化，再由 T4 连接酶将 DNA 分子间的钝端（齐平的末端）共价连接。这些末端延伸物被适当的限制性酶切割后就产生粘性末端（图31-21）。因此，对特定限制性酶专一的相应粘性末端实际上能在任何 DNA 分子上剪裁形成。

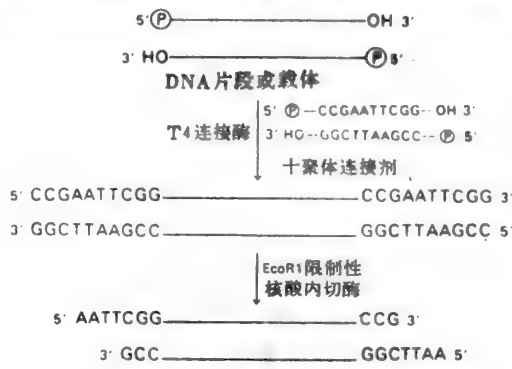


图31-21 加入和裂解化学合成连接剂以形成粘性末端。

### 质粒及λ噬菌体是在细菌中克隆DNA的上选载体

为加强重组 DNA 的递送以及有利于怀有载体的细菌的选择，新的载体正在制造中。例如，质粒 pBR322 含有抗四环素性及抗氨苄青霉素（类似青霉素的抗菌素）性的基因。这种质粒可被五种不同核酸内切酶在单个位点切开（图31-22）。在 EcoRI 限制性位点上插入 DNA 并不改变任一种耐抗菌素性的基因。但是，DNA 若插在 HindIII, Sal I 或 BamHI 限制性位点上，则导致抗四环素性基因的失活，此效应称作插入失活作用。含有 DNA 插入的 pBR322 的细胞对氨苄青霉素具抗药性，但对四环素敏感，所以他们就易被选择。未能摄取这载体的细胞对二种抗菌素均敏感，而含有无 DNA 插入的 pBR322 细胞则对二种抗菌素均有抗药性。



图31-22 具有两种对抗菌素有抗药性基因的质粒 pBR 322 基因图。

如，质粒 pBR322 含有抗四环素性及抗氨苄青霉素（类似青霉素的抗菌素）性的基因。这种质粒可被五种不同核酸内切酶在单个位点切开（图31-22）。在 EcoRI 限制性位点上插入 DNA 并不改变任一种耐抗菌素性的基因。但是，DNA 若插在 HindIII, Sal I 或 BamHI 限制性位点上，则导致抗四环素性基因的失活，此效应称作插入失活作用。含有 DNA 插入的 pBR322 的细胞对氨苄青霉素具抗药性，但对四环素敏感，所以他们就易被选择。未能摄取这载体的细胞对二种抗菌素均敏感，而含有无 DNA 插入的 pBR322 细胞则对二种抗菌素均有抗药性。

另一组载体来自 ColE1，后者是为大肠杆菌素 E（能杀死某些大肠杆菌株的蛋白质毒素）编码的质粒。利用这些大肠杆菌素原质粒作为载体的一个优点是它们的复制并不受到严格控制。在一个感染的细胞中，常有约 25 个拷贝 ColE1 存在。用氯霉素处理，可阻断蛋白质合成及宿主染色体的复制。但 ColE1 的复制在这些条件下仍继续进行。事实上，在一个经氯霉素处理的细胞中，可有 1000 个拷贝 ColE1 累积，所以这种质粒几乎占细胞 DNA 的一半。

λ噬菌体是另一种上选的载体。它的 48kb 的 DNA 中有多数片段对溶解性感染或整合过程皆非必需，并可由外来 DNA 所取代。为克隆 DNA 而设

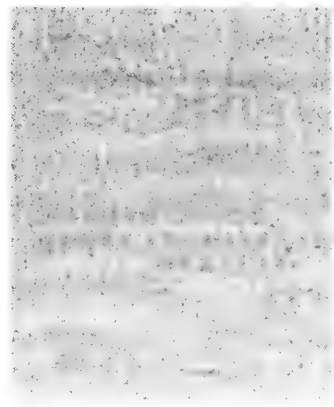


图31-23 ColE1 质粒的电镜图。[蒙 Dr. Jack Griffith 特许。]

计的 $\lambda$ 噬菌体突变株已被制成。其中一种叫做 $\lambda$ gt- $\lambda$  $\beta$ 的突变株只有二个EcoR 1裂解位点而不象正常那样含五个裂解位点(图31-24)。裂解以后,这个 $\lambda$  DNA分子的中间片段可被移除。余下的二段DNA共长约为一个单位基因组的72%。这个DNA量太少,不能包装到 $\lambda$ 的头部内。便于包装的长度范围是一个单位基因组的75-105%。但是,在 $\lambda$  DNA的二末端间如有一个合适长度的插入DNA(例如10kb),就能使这一重组DNA分子(93%长度)包上衣壳。几乎所有这样形成的感染性 $\lambda$ 颗粒都含有一插入的外来DNA片段。用这种病毒粒子作为载体的另一优点是它们进入菌体比质粒有更高的频率。目

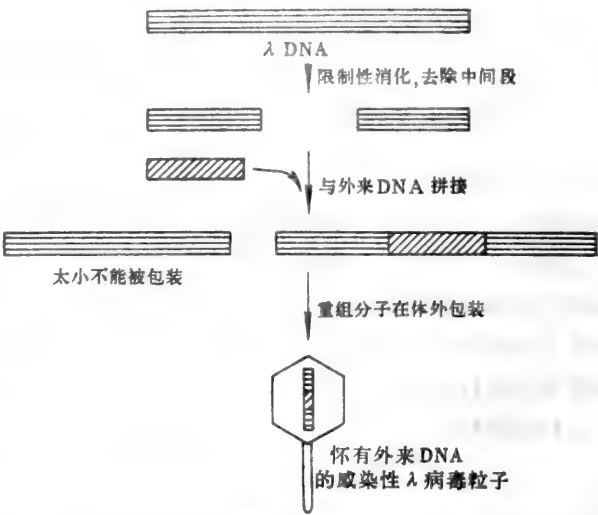


图31-24 用作克隆载体的 $\lambda$ 噬菌体变异株。包装反应可对含有插入序列的DNA分子加以选择。

前重组的DNA分子已能在体外被包装,形成感染性的 $\lambda$ 病毒粒子。现已制成不同品种的、用作克隆载体的 $\lambda$ 突变株。其中有些甚至可用作长达40kb的插入DNA的载体。

### 从基因组DNA的消化液开始 克隆真核细胞的特定基因

前章(534页)中已提到,真核细胞基因组的分析是一艰巨的难题。一个1kb基因是大肠杆菌基因组的 $2.5 \times 10^{-4}$ ,而在哺乳动物基因组中它只是 $3.4 \times 10^{-7}$ 。目前DNA重组技术已使真核细胞基因插入大肠杆菌成为可行,由而大大减少了这个难题的复杂性。实验是从真核细胞基因组的部分消化开始,使随机产生平均长度约为20kb的片段(图31-25)。把合成的连接剂连接在这些片段末端,形成粘性末端,然后将这些片段连接到诸如 $\lambda$ 噬菌体DNA的载体上。在体外能包装进入病毒粒子的DNA需选含有大插入段的重组DNA分子。以后用这些重组噬菌体去感染大肠杆菌。最后产生的溶解物中含有寄居在噬菌体内的真核细胞DNA片段,并被扩增了约100万倍。实际上,这种溶解物就是一个真核细胞DNA的克隆库。

为了鉴别含有某一特定真核细胞基因的噬菌体克隆,必须对这种克隆库进行筛选。计算表明,在180,000克隆

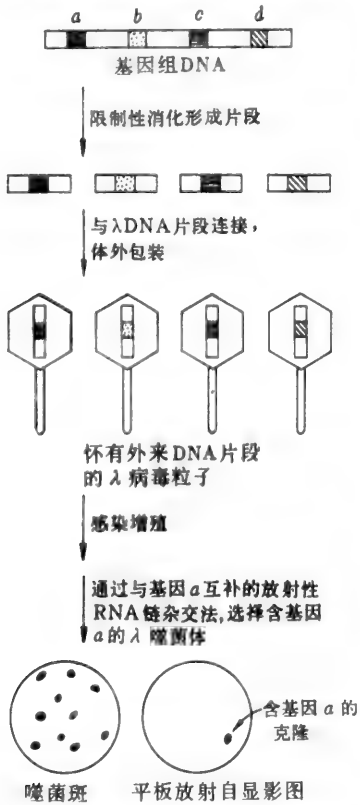


图31-25 从整个基因组的消化液着手,对特定真核细胞基因进行克隆的战略步骤。

中仅有一个克隆是携带一个单拷贝真核细胞基因的。所以，必须要有一个迅速而有效的筛选方法。这一目标通过杂交技术得到成功。在—单个λ噬菌体斑块中，要检测特异DNA序列的存在，可利用放射性的互补DNA或RNA分子作为探针，并用放射自显影术来观察其结合。用这种方法每天可方便地筛选100万克隆。所以，一个含有一个特定真核基因的克隆，如果有其相对较纯的RNA转录本的话，就能方便地加以鉴定及分离。

真核细胞基因可在细菌的细胞中被转录及翻译

带有细菌基因的重组DNA分子常可在大肠杆菌中得到表达。例如，由ColE1质粒载体携带的大肠杆菌的色氨酸操纵子的克隆化，得以实现高水平生产由这操纵子所决定的五种生物合成酶。由于存在着多拷贝的重组质粒，这些酶的量约是正常大肠杆菌细胞中的20倍。简单的真核细胞酵母，它的DNA亦能在细菌中表达。在一个研究中，宿主细胞是一种大肠杆菌突变株，后者由于缺乏咪唑甘油磷酸脱氢酶，所以需要组氨酸。用含有酵母DNA片段的入噬

菌体去感染这种突变株，产生了几不再需要外源组氨酸的细菌克隆。插入的酵母DNA片段提供了丢失的基因，它通过细胞的转录及翻译机制而被表达。

哺乳动物的基因能否在细菌中表达?为了探索这一问题，人们将大鼠胰岛素基因导入大肠杆菌（图31-26）。实验是以分泌大量胰岛素的胰岛瘤作为起点。这种肿瘤富含合成前胰岛素原——活性激素的前体（660 页）所需的mRNA。将这

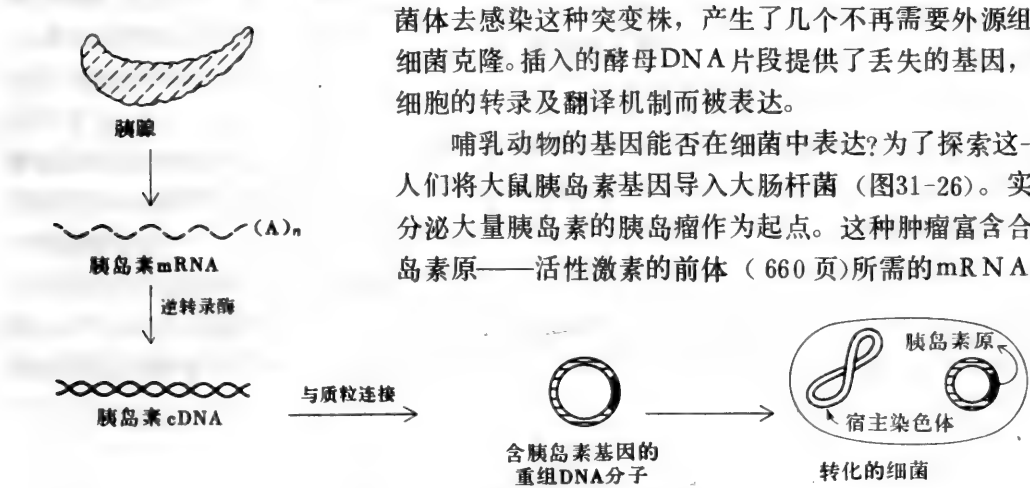


图31-26 转化的大肠杆菌克隆合成胰岛素的前体——胰岛素原。

mRNA进行逆转录而制备出双链cDNA，并将它插入质粒载体。为什么将cDNA而不是基因组DNA导入大肠杆菌？前已提及，许多真核细胞的基因中含有间隔顺序，后者要从初级转录本中切割下来（548 页）。细菌也许不能移除这些顺序，所以需用与成熟mRNA互补的DNA片段去转化细菌。实际上，已经发现几种由这种胰岛素cDNA转化的细菌克隆能合成少量的胰岛素前体（每个细胞约100拷贝）。最近另一重要的发现是，为鸡卵白蛋白编码的DNA序列在大肠杆菌中得到表达。由这些转化细菌合成的蛋白质中约1.5%是全长(43kda)的卵白蛋白。因此非常清楚，真核细胞蛋白质的基因能在细菌中得到表达。

一种化学合成的生长激素释放抑制因子（一种肽类激素）基因在大肠杆菌中得到表达

关于特异DNA序列化学合成方面的最近进展使DNA重组技术范围及权能得到加强。

cDNA——以RNA为模板经逆转录酶而合成的互补DNA。

具任何核苷酸顺序的基因几乎都能被新合成，它们还能被插入载体以递给大肠杆菌。这种尝试的一个良好例子是生长激素释放抑制因子（一个在下丘脑提取液中发现的14肽）基因的合成（图31-27）。生长激素释放抑制因子抑制生长激素、胰岛素及胰高血糖素的分泌。将8个寡核苷酸构件连接起来能合成为这种肽编码的DNA分子。

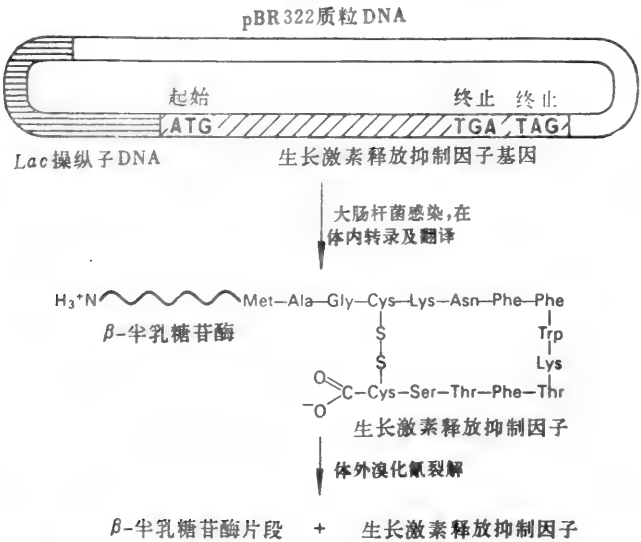


图31-27 被化学合成的基因转化的大肠杆菌能合成一种肽类激素——生长激素释放抑制因子。

生长激素释放抑制因子的羧基端是游离的，因为在此肽的最后残基的密码子之后有二个终止密码（图31-27）。这嵌合蛋白组成了总细胞蛋白质量的一个相当部分（约3%）。此外，用这种方法产生的生长激素释放抑制因子具有生物活性，所以，通过化学合成基因的克隆化能生产出有功能的多肽。

### 基因克隆所产生的冲击

DNA重组技术为分子生物学开拓了新的远景。通过在细菌中的克隆化，基因的扩增为电泳及顺序研究提供了大量的DNA。人们也用它分析研究一些控制基因移动、DNA复制及转录的特异DNA区域。新的见解日趋形成，例如在许多真核细胞中发现了许多间隔顺序。复杂的染色体图很快地被测绘出来并解析为能被操作及研究的单位。研究的步伐已大大加快。基因克隆化也正在成为获取大量特异蛋白质的重要方法。例如，DNA重组技术能使大肠杆菌产生DNA连接酶的量提高500倍。用转化的细菌进行真核细胞的肽及蛋白质的合成是非常有前途的。激素如胰岛素及抗病毒因子如干扰素，不久将会由细菌来生产。一种可能对医学有深刻影响的新的药理学正在开始出现。基因克隆化在农业增产方面的潜力亦正在研究开发中。目前，真核细胞的基因如同被导入细菌一样也正在设法导入真核细胞。例如，SV40病毒已被用作载体，以期把兔 $\beta$ 球蛋白基因带入猴肾细胞。这些经感染的细胞合成大量兔 $\beta$ 球蛋白。用这一实验途径阐明真核细胞基因表达的调节机制，是有前途的方法。

### 概 要

基因的重组是通过DNA链的断裂及再结合以形成新的DNA分子。亲代DNA分子中的

任何一对同源顺序都可交换，因此这种过程称为普通基因重组。大肠杆菌的普通重组是由 $rec$ 基因作用介导。 $recBC$ 蛋白是一种核酸酶，它产生的单链DNA能攻击双链DNA分子。这种链的同化反应由 $recA$ 蛋白所催化，它同时能水解ATP。

非同源座位的遗传重排是由称为易位子的（移位元件）移动性遗传元件所媒介。具小环状DNA双链的质粒，是一类重要的移动性遗传元件。这些副染色体携带的基因是抗菌素失活、天然产物的代谢以及产生毒素的基因。质粒可以自主地复制或整合到宿主染色体中。F因子（致育因子）质粒能使细菌通过接合作用将其基因提供给另外细菌，这一过程是经过供体（ $F^+$ ）细胞和受体（ $F^-$ ）细胞间直接物理性的接触而实现。R因子质粒提供对抗菌素的抗药性。其中一些较大的质粒含有一抗性转移因子（RTF），它使质粒通过接合作用传递给另外细菌。几种提供对抗菌素抗药性的基因可与RTF区连接起来。因此，对多种药物的抗药性可以是传染性的。易位子由于两端围有插入序列而具有高度移动性。这些末端序列能指导一些蛋白质的作用，即介导这些序列整合进入DNA。易位子不需要与受体DNA同源。

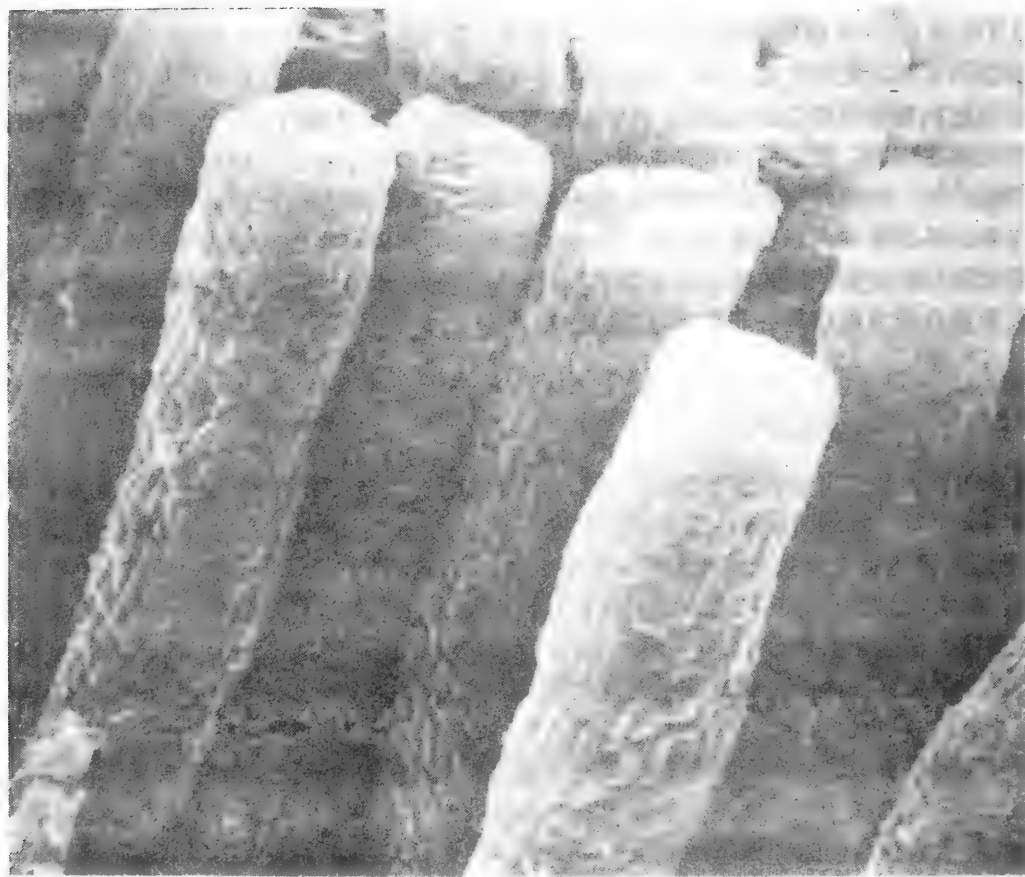
无关基因的新组合已能在实验室里建成并在宿主细胞内克隆化。合成一个重组的DNA分子时，首先将一个DNA片段连接到一DNA载体上，此载体能在适当的宿主细胞内自主复制。 $\lambda$ 噬菌体、SV40病毒及质粒皆为上选载体。限制性酶及DNA连接酶是形成新DNA分子的必需工具。粘性末端，均一多聚物尾及化学合成的连接剂是连接DNA分子的三种办法。用重装配病毒去感染宿主细胞，或将后者暴露在裸露的DNA分子中，就可将重组的DNA分子引进宿主细胞。最后的步骤是选出怀有所需的重组DNA分子的细胞，这可以用检测新引入的基因的一种特性（例如抗药性）来筛选。从基因组DNA的消化液着手，一些特异的真核细胞的基因能在大肠杆菌中克隆。许多真核细胞的基因可在细菌细胞中转录及翻译。基因克隆化在分析复杂基因的结构及表达方面是一有效的技术。重组DNA技术在合成大量的稀有基因及蛋白质方面亦是一非常有希望的方法。



## 第五篇 分子生理学

生理过程中信息、构象和代谢的相互作用

(严有为 赵宝光 译, 张惠珠 校)



视网膜视杆细胞的扫描电镜图。一个视杆细胞能被一个光子激发。〔蒙Dr. Deric Bownds特许。〕



## 第32章 细菌细胞被膜

细菌细胞不同于动物细胞，它被细胞壁所包裹，细胞壁给细胞以机械支撑，并使其具有独特的形状。细菌的细胞膜本身不能承受细胞内的高渗透压，由于内部代谢物的高浓度，致使该渗透压可达20大气压。在通常的介质中，细菌细胞将发生溶胞作用，除非它被细胞壁所包裹。

细菌细胞壁在医学上是十分重要的。细胞壁及与其相联系的物质对细菌的毒性负主要责任。实际上，向实验动物体内注射分离的细菌细胞壁能够产生很多细菌性疾病的症状。而且，细菌的特征抗原就位于它们的细胞壁上。将细菌细胞壁的提取物注射于动物体内，可使后者获得对一些细菌的免疫性。最后，阻止细菌细胞壁的合成，就能置细菌于死地。实际上，这就是青霉素及其它一些抗菌素的作用机理。

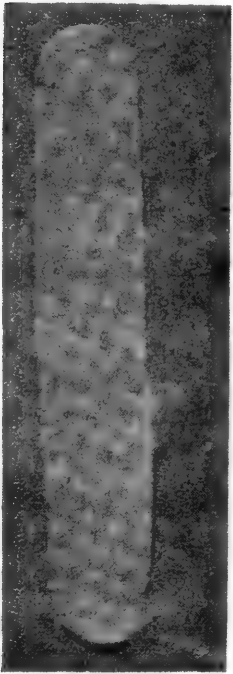


图32-1 分离的地衣形芽孢杆菌细胞壁的电子显微照片。[蒙Dr. Nathan Sharon特许。]

半个多世纪以来，一直根据细菌的革兰氏染色反应，把细菌分为革兰氏阴性或革兰氏阳性两类。现在已理解了这种经验区分的基础。这两类细菌具有不同种类的细胞被膜（图32-2）。革兰氏阳性细菌的质膜被厚细胞壁包裹，这层厚细胞壁由肽聚糖和磷壁酸质组成，典型的厚度是250Å。革兰氏阴性细菌具有更复杂的细胞被膜，它们的质膜被厚度为30Å的肽聚糖壁包裹，这层壁又被厚度为80Å的外膜覆盖，后者是蛋白质、脂类和脂多糖的嵌合体。

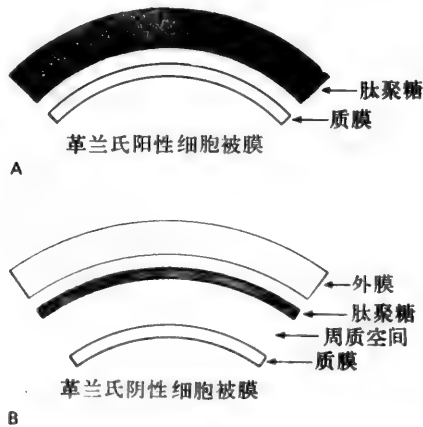


图32-2 (A)革兰氏阳性和(B)革兰氏阴性细菌细胞被膜差别的图解。

细胞壁是一个巨大的袋状大分子

让我们考虑金黄色葡萄球菌细胞壁的结构和生物合成。这是一种引起皮肤、骨骼和肺等

组织生浓感染的革兰氏阳性细菌。该细胞壁大分子被称为肽聚糖，因为它是由肽和糖单位组成的。在肽聚糖中，直链多糖链被短肽交联。肽聚糖广泛形成交联，从而得出一个单一的巨大袋状大分子。分离后得到的细胞壁的形状与它先前包裹细菌时的形状相同。

肽聚糖由三种重复单位组成（图32-3）：（1）N-乙酰葡萄糖胺（NAG）和N-乙酰胞壁酸（NAM）由 $\beta$ -1,4-糖苷键合的二糖；（2）由L-丙氨酸，D-谷酰胺，L-赖氨酸和D-丙氨酸组成的四肽；和（3）五聚甘氨酸桥肽。上述四肽在两方面不同寻常。它含有蛋白质中从未发现过的D-氨基酸。而且，在D-谷酰胺残基的侧链 $\gamma$ -羧基处形成了肽键。

在完整的肽聚糖中，NAG和NAM相继交替出现，形成直链多糖。五聚甘氨酸肽交联不同多糖链上的NAM残基。（Gly）<sub>5</sub>的氨基与D-丙氨酸的羧基形成肽键。同时，（Gly）<sub>5</sub>的羧基与L-赖氨酸侧链的 $\epsilon$ -氨基也形成肽键。

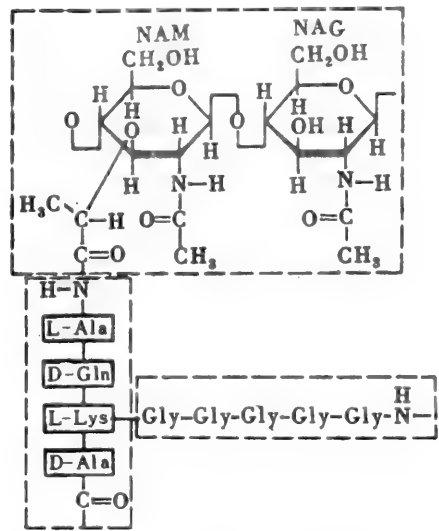


图32-3 金黄色葡萄球菌中肽聚糖的基本结构单位。

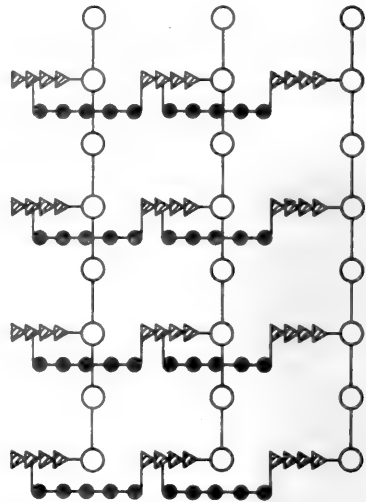


图32-4 肽聚糖图解。糖用空心圆表示，四肽用三角形表示，五聚甘氨酸桥用黑色小圆表示。由于广泛交联，细胞壁是一个单一的巨大袋状大分子。

## 肽聚糖合成的步骤

肽聚糖的合成有五步：

1. 当NAM结合于尿苷二磷酸上时，一个肽单位接到该糖上。
2. NAM-肽单位转移到一个载体脂上。在细胞壁的合成中遇到一个特殊问题，就是最后的聚合产物位于细胞的通透性屏障的外侧，而前体却是在细胞内形成的。UDP极性太强，不能穿过膜。相反，载体脂则由于它的高非极性，可以起到跨膜运载工具的作用。
3. 当NAM-肽单位结合在载体脂上时，NAG和五聚甘氨酸桥加到该单位上。
4. 二糖肽单位从载体脂上转移到生长着的多糖链上。
5. 包含五聚甘氨酸桥的转肽反应将不同的多糖链交联。

## UDP-糖-肽单位的合成

肽聚糖的生物合成始于活性糖的形成。N-乙酰葡萄糖胺1-磷酸和UTP反应合成尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-NAG)，该反应由PP<sub>i</sub>的水解所驱动(图32-5)。尿苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸(UDP-NAM)是由UDP-NAG和磷酸烯醇式丙酮酸形成的(图32-6)。

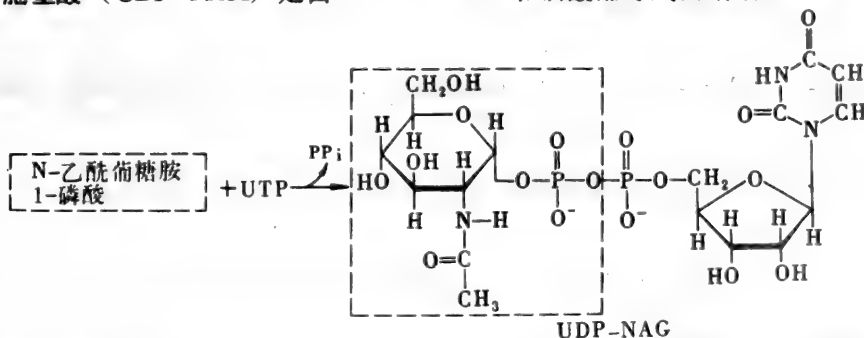


图32-5 UDP-NAG的合成。

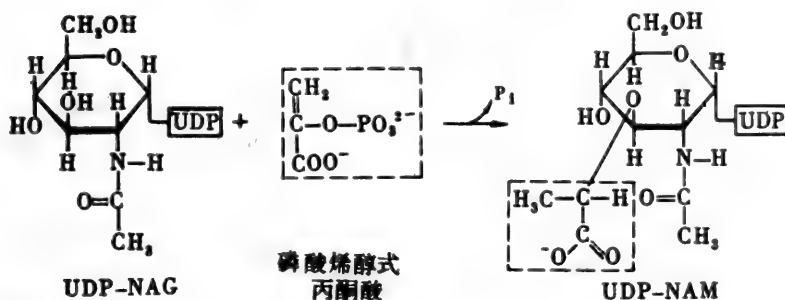


图32-6 UDP-NAM的合成。

肽链的生长是从L-丙氨酸的氨基与UDP-NAM中的N-乙酰胞壁酸部分的羧基间形成肽键开始的。D-谷氨酸、L-赖氨酸和二肽D-丙氨酰-D-丙氨酸则相继连接上去(图32-7)。通过含有吡哆醛磷酸辅基的消旋酶的作用，D-氨基酸由它们的L-异构体形成。每个肽键的形成均需要一个ATP。这些肽键的合成是由特殊的酶催化，不是通过蛋白质合成的核糖体途径。有关肽的氨基酸顺序的信息决定于酶的内在专一性，而并不在信使RNA的碱基顺序中。这类肽不能通过一般蛋白质合成的机制合成，因为它含有D-氨基酸和一个γ-肽键。

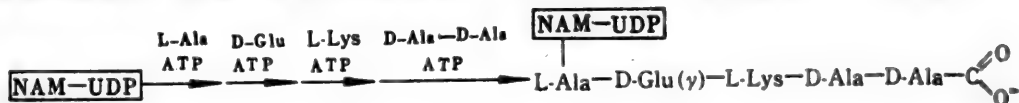


图32-7 接在UDP-NAM上的五肽的合成。

## 糖-肽单位向载体脂的转移

活化的糖-肽单位随后从UDP转移到一个载体脂上(图32-8)。这个磷酸化长链醇含有

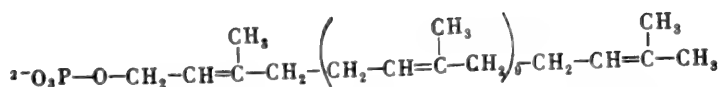
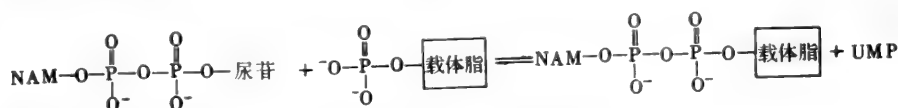


图32-8 细胞壁生物合成中的载体脂结构。

十一个异戊二烯单位,它们使该载体脂与UDP不同,具有很强的疏水性。很可能C<sub>55</sub>载体脂的疏水性使新生的糖-肽单位得以穿过由细胞膜造成的通透性屏障。我们记得另一种称为多



萜醇磷酸的高疏水性载体参与了真核细胞糖蛋白的寡糖核心合成(560页)。

### 接在载体脂上的二糖-肽单位的合成

下一步是把NAG加到糖-肽和载体脂单位的NAM部分上。活化的糖供体UDP-NAG与NAM单位的C-4反应,在这两个糖之间形成β-1,4-糖苷键(图32-9)。这个肽的D-

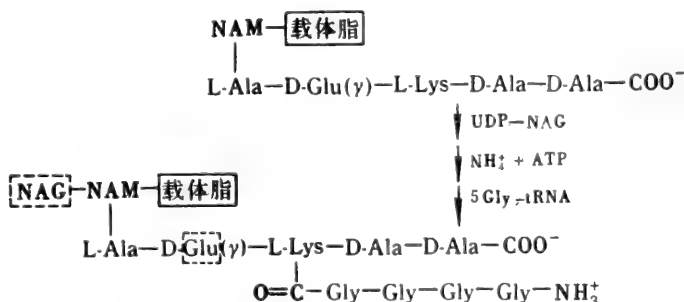


图32-9 接在载体脂上的二糖-肽单位的合成。

谷氨酸的游离α-羧基在由ATP水解作用驱动的反应中被NH<sub>4</sub><sup>+</sup>酰胺化。然后,五聚甘氨酸桥单位接加到该肽段赖氨酸残基的ε-氨基上。这个五甘氨酸残基链是由甘氨酰-tRNA将单个甘氨酸残基一个个地连续转移形成的。这是一个独特的反应,因为tRNA并不只是在核糖体上合成蛋白质时才用作氨基酸的供体。现在完成了建造细胞壁的基本结构单位。

### 二糖-肽单位向生长着的多糖链转移

二糖-肽单位从载体脂转移到生长着的多糖链的非还原端。NAM部分的C-1碳是活化的,因为它由焦磷酸键与载体相连。活化的NAM单位的C-1碳与生长着的多糖链的NAG末端的C-4形成β-1,4-糖苷键(图32-10)。

载体脂以焦磷酸形式释放出来。然后,它由特异的磷酸酶水解成单磷酸形式。该脱磷酸化步骤对于从UDP接受糖-肽单位的分子的再生是必需的。杆菌肽,一种肽类抗菌素,就是通过阻止这一步骤来抑制细胞壁的生物合成。

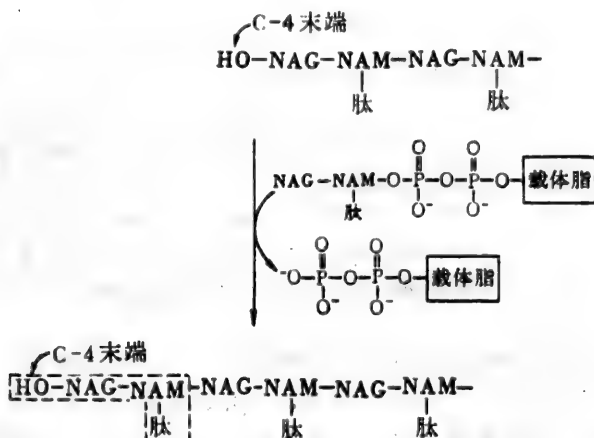
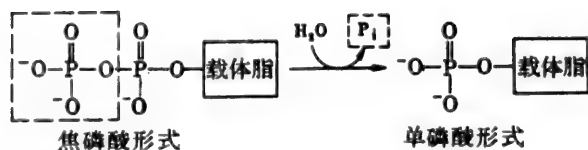


图32-10 二糖-肽单位向生长着的多糖链转移。

### 转肽作用使多糖链交联

转肽作用使不同的多糖链交联，形成一个巨大的袋状分子。一个五聚甘氨酸桥末端的氨

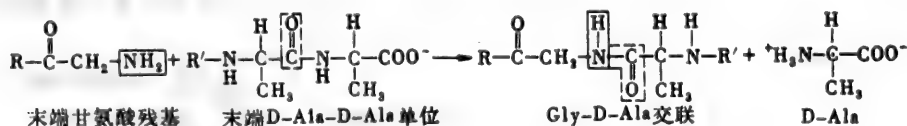


图32-11 五聚甘氨酸桥的氨基作用于两个D-Ala残基之间的肽键形成交联。

基作用于另一个肽单位的D-Ala-D-Ala残基之间的肽键(图32-11)。于是一个肽键在甘氨酸与一个D-丙氨酸残基之间形成，而另一个D-丙氨酸残基则被释放。该反应系由糖肽转肽酶催化。注意，在这个交联合成中未消耗ATP。该转肽反应使用的是D-Ala-D-Ala键内已经存在的自由能。这种不寻常的肽键形成方式可能是必需的，因为该反应发生在细胞膜外侧，无法接触ATP。我们记得，在血纤维蛋白通过转酰胺基反应的交联中形成肽键时亦未使用ATP (134页)。

### 革兰氏阳性细菌的肽聚糖

#### 上覆盖着磷壁酸质

革兰氏阳性细菌的表面系由磷壁酸质组成。磷壁酸质是由磷酸二酯桥连接的甘油(或其它糖，如核糖醇)多聚物(图32-12)。可用的羟

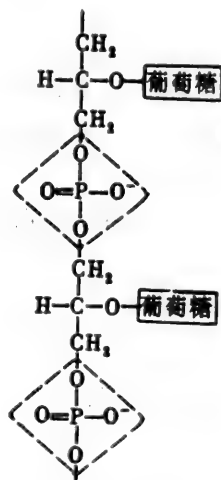


图32-12 磷壁酸质的结构

基已与丙氨酸或象葡萄糖这样的糖所酯化。磷壁酸质通过磷酸二脂键与肽聚糖的NAG-NAM骨架结合。磷壁酸质链的延长是通过CDP-甘油将磷酸甘油转移到该链的自由羟基末端。葡萄糖再添加到磷壁酸质主链的羟基上,该过程是通过与UDP-葡萄糖的反应实现的。

青霉素抑制细胞壁的合成而使生长中的细菌死亡

青霉素是弗莱明, A. (Alexander Fleming) 在1928年发现的,这是一次偶然观察的结果:

在对葡萄球菌变种的研究中,若干培养皿放置在实验台上,并经常进行观察。在观察时培养皿必然要暴露于空气,于是它们被不同的微生物污染。弗莱明注意到,在污染有霉菌大菌落的周围,葡萄球菌菌落变得透明,并明显地发生着溶胞作用。

将此霉菌再次培养,并有目的地进行实验,以求确定有关溶菌物质的某些性质。这些溶菌物质在霉菌培养中显然已经形成,而且已扩散到周围的介质中。他们发现,在室温下培养霉菌一到两周后的培养液获得了对很多较普遍的致病细菌有明显的抑制、杀菌和溶菌性质。

弗莱明又发现,将青霉菌的抽提物注射进动物体内时,并无明显的毒性,这一点更进一步激励着他。然而,当他试图浓缩并纯化这种活性抗菌素时却发现:“青霉素易被破坏,我们的全部意图和目的都失败了。我们是细菌学家,而不是化学家,我们的比较简单的实验方法已经不够用了。”

重新研究青霉素,已是十年以后的事了。病理学家弗洛里, H. (Howard Florey) 和生物化学家钱恩, E. (Ernst Chain) 进行了一系列深入的研究,导致了对这个抗菌素的分离、化学表征和临床应用方面的成果。青霉素系由与 $\beta$ -内酰胺环融合的噻唑烷环组成,可变基(R)通过肽键与它连接。例如,在苄青霉素中,R是苄基(图32-13和32-14)。这个结构可以发生多种重排,这就是弗莱明首先遇到的不稳定性的原因。 $\beta$ -内酰胺环尤其是非常不稳定的。实

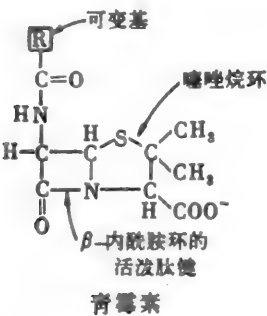


图32-13 青霉素的活泼部位是它的 $\beta$ -内酰胺环的肽键。R 基团是可变的。在苄青霉素中,R是苄基。

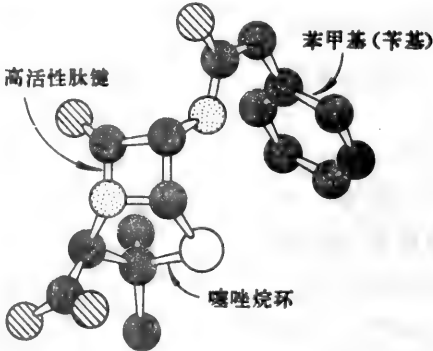


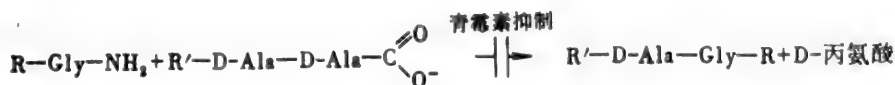
图32-14 苄青霉素模型。

际上,这一性质与青霉素的抗菌活性紧密相关,对此我们即将进行讨论。

1957年,里德伯格, J. (Joshua Lederberg) 证明,通常对青霉素敏感的细菌,如果使用了高渗介质,则它能在青霉素存在的情况下生长。用这种方法得到的有机体称为原生质体,它们没有细胞壁,因此把它们转移到普通介质中就被溶解。于是,人们推测,青霉素妨碍了细菌细胞壁的合成。1965年,帕克, J. (James Park) 和斯特罗门杰, J. (Jack Strominger) 分别独立地推断,青霉素是阻止了细菌细胞壁生物合成的最后一步反应,即交联反应。

## 青霉素抑制转肽作用使细胞壁的合成受阻

青霉素抑制了使不同的肽聚糖链交联的转肽酶。



转肽酶通常与肽的倒数第二个D-丙氨酸残基形成酰基中间体（图32-15）。这个酰基-酶中间体再与另一个肽的末端甘氨酸中的氨基反应。新近的研究表明，青霉素抑制转肽酶是由于它与位

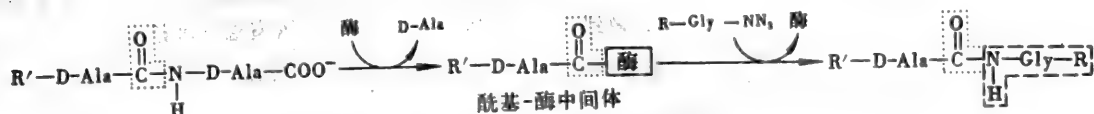


图32-15 在转肽反应中形成了酰基-酶中间体。

于该酶的活性部位上的丝氨酸残基形成了共价键（图32-16）。这个青霉素酰-酶复合物不能进行脱酰化作用。因此，转肽酶受到了青霉素的不可逆抑制。

为什么青霉素对转肽酶是如此有效的抑制剂呢？分子模型已揭示出，青霉素与该酶的一种底物，酰基-D-Ala-D-Ala相象（图32-17）。而且，青霉素的β-内酰胺四元环是带有张力的，它使这个肽键具有高活泼性。实际上，青霉素可能具有正常底物的过渡态结构。换句话说，青霉素是一个过渡态类似物。

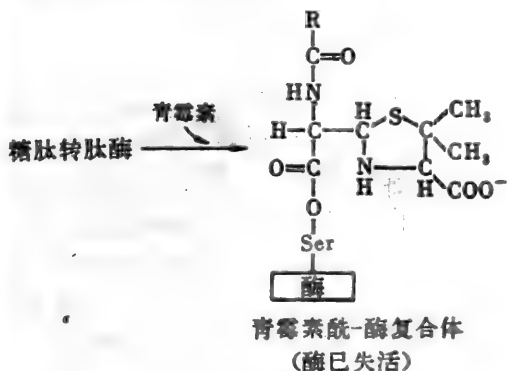


图32-16 极稳定的青霉素酰-酶复合物的形成。

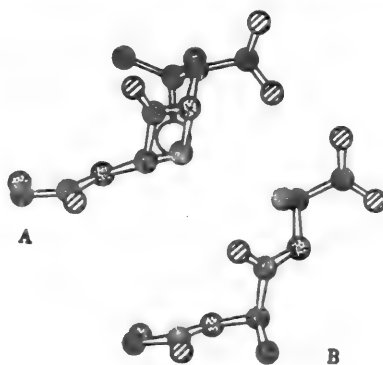


图32-17 在青霉素活泼肽键附近的构象。

(A) 与假定的R-D-Ala-D-Ala的过渡态构象相似。

(B) 在转肽反应中。[引自B. Lee, *J. Mol. Biol.* 61

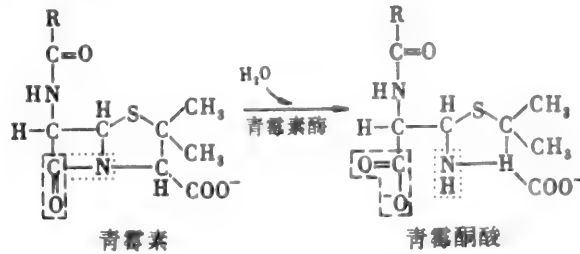
(1971): 464.]

把青霉素与酶的其它一些不可逆抑制物作一比较是令人感兴趣的。稳定的，无活性的青霉素酰-酶复合物与磷酰-酶复合物相似，后者是由有机的氟化磷酸与乙酰胆碱酯酶或丝氨酸蛋白酶反应生成的。然而，青霉素比氟化磷酸抑制剂专一得多。青霉素的反应性在于它是精确的靶标，这是因为青霉素的结构与新生肽聚糖链的末端D-Ala-D-Ala相似。青霉素的低毒性，对它的疗效很重要，这也是它精确专一性的结果。在人体内没有已知能识别D-Ala-D-Ala的

酶，因此，青霉素并不干扰我们自身的酶机器。

有些细菌对青霉素有抗性，因为它们能合成一种破坏青霉素的酶

有些细菌分泌青霉素酶。这是一种能使青霉素的 $\beta$ -内酰胺环中的酰胺键断裂而形成青霉酮酸的酶。青霉酮酸并无抗菌素活性：



已分离得到多种相关的青霉素酶，它们的质量约为30kda1，并具有高转换数（典型值为 $10^3\text{s}^{-1}$ ）。酶的活性显著地依赖于连接在青霉素的 $\beta$ -内酰胺环上的R基团的性质。含有对青霉素酶不敏感的R基团的半合成青霉素具有临床上的重要性。

青霉素酶的基因位于各种各样的质粒上（594页）。这些染色体外的遗传元件易被某些种属的细菌失去或取得。在某些细菌菌株中，这种酶是可诱导的。青霉素酶可能是作为一种解毒机制进化而来的，因为它只在具有肽聚糖壁的有机体内被发现。当不存在抗菌素时，失去这种基因并无有害影响，考虑到这一事实，这种酶可能除了破坏青霉素外没有其它功能。而且，对青霉素的抗药程度与青霉素酶的活性大小之间存在着很好的相关性。

### 富含脂多糖的外膜包裹着革兰氏阴性细菌

如前所述，革兰氏阴性细菌的细胞被膜比革兰氏阳性细菌的更复杂。革兰氏阴性细胞（如大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌）的肽聚糖层又被含有磷脂、蛋白质和脂多糖的外膜包裹。这种外膜象质膜一样，具有双层排布。这样，革兰氏阴性细菌有两层膜，而革兰氏阳性细胞只有一层。革兰氏阴性细菌的特点是在它的质膜和肽聚糖层之间有一含水区域。这个周质空间含有很多与糖和其它营养物结合并运送这些物质的蛋白质（706页）。

在外膜中的脂多糖（LPS）是由三个区域组成的十分不寻常的分子：脂A、核心寡聚糖以及O侧链（图32-18）。脂A部分是这个大的（10kda1）亲水脂分子的疏水部分。它含有六个连接在二个葡糖胺残基上的饱和脂肪酸链。这些脂酰链构成了大约一半外膜的外叶。内叶不含脂酰链，而含磷脂（图32-19）。下一个区域是脂多糖的核心寡聚糖。在这个区域里十个糖单位突向外侧。接着是O侧链，后者由很多重复的四聚糖单位构成。这两个区域含有若干个实际上在自然界其它地方很少存在的糖：2-酮-3-脱氧辛糖酸（KDO），一种八碳糖；庚糖，一种七碳糖；和L-鼠李糖及阿比可糖，在C6处由 $-\text{CH}_3$ 替代 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 的六碳糖（图32-20）。核心寡聚糖和O侧链与脂A的脂酰部分相反，它们是高度亲水的。脂多糖分子带负电荷，因为



它的若干个糖是磷酸化的。

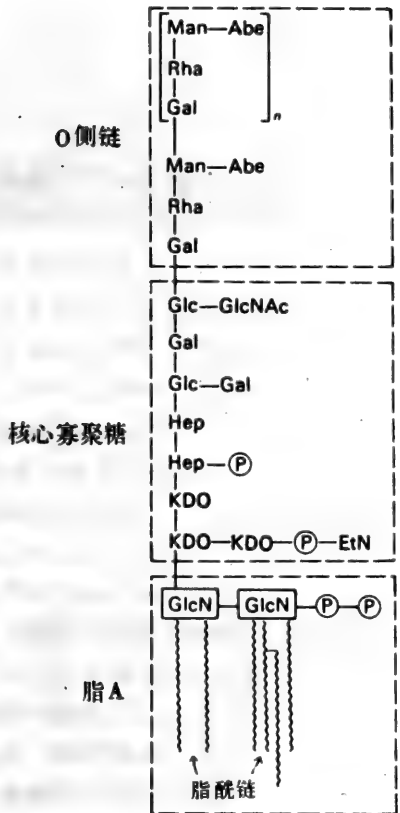


图32-18 脂多糖分子由三个区域组成:脂A、核心寡聚糖以及O侧链。这里示出的特定的糖顺序取自鼠伤寒沙门氏菌。所使用的缩写为: Abe, 阿比可糖; EtN, 乙醇胺; Gal, 半乳糖; Glc, 葡萄糖; GlcN, 葡萄糖胺; GlcNAc, N-乙酰葡萄糖胺; Hep, 庚糖; KDO, 2-酮-3-脱氧辛糖酸; Man, 甘露糖; Rha, L-鼠李糖。

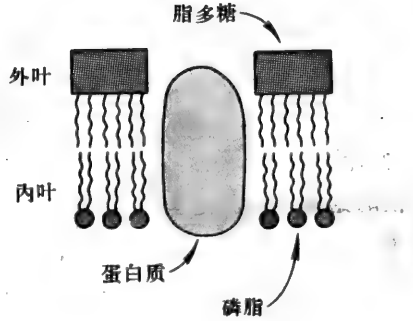


图32-19 脂多糖分子位于外膜的外叶,而磷脂则位于外膜的内叶。

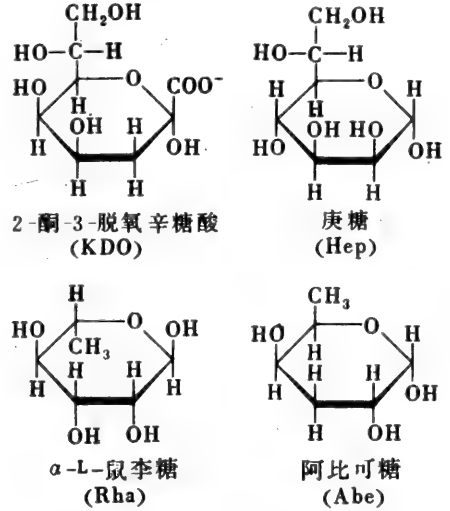


图32-20 脂多糖中一些稀有糖的化学式。

脂多糖在质膜内合成,然后再转移到外膜。首先合成脂A,然后,来自活化供体诸如

UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的糖依次加上去,就形成核心多糖。O侧链则以不同的方式装配起来。它的重复四糖单位在一个载体脂上合成,即与肽聚糖合成中所使用的C<sub>55</sub>-异戊二烯相同的载体脂(606页)。这些单位的生长着的链通过一个寡聚糖从一个载体转移到另一载体的单一重复单位上而延长(图32-21)。这种延长模式类似于脂肪酸的合成(305页)和蛋白质的合成(514页)。最后,O侧链被加到这个核心寡聚糖的尖端上。

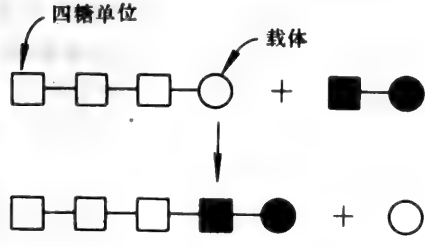


图32-21 O侧链的延长模式。

O 侧链的重复四糖看来象是在质膜的内叶上建造的，然后再转移到外叶上，它在那里被加到正在生长的链上。完成的脂多糖分子可能从质膜通过它与外膜之间的粘连物移位到外膜上。

O 侧链的多样性有助于革兰氏  
阴性细菌避开宿主的防卫

脂多糖含有十分稀有的糖和与众不同的键。这些奇异分子的作用是什么呢？在脂多糖合成中，有缺陷的突变种已提供了有关它们功能的线索。脂 A 区域和毗邻的核心寡聚糖的 K D O 糖可能对其生存性是必不可少的。饱和脂酰链有助于外膜的屏障作用，它们把周质蛋白质关在里面，而把大多数有毒分子排斥在外。例如，青霉素不容易进入革兰氏阴性微生物。脂 A 区域可能还使外膜具有刚性。与此相反，O 侧链则对生存性并非必需。例如，很多生物化学



图32-22 沙门氏菌经一种温和噬菌体P22感染后在O侧链上产生的结构变化。

家特别感兴趣的大肠杆菌K 12菌株就没有O 侧链。然而，在天然条件下生存的革兰氏阴性微生物几乎总具有O 侧链。多糖外壳使细菌的表面非常亲水，使细菌对宿主细胞的吞噬作用敏感性减弱。而且，脂多糖的O 侧链是变化多端的；图32-18所示的结构仅仅是很多已发现的结构中的一种。革兰氏阴性细菌能迅速突变，以改变其O 侧链的本质。一个未接触过这种新表面结构的宿主群体最初只具有一个低水平的直接对抗新O 侧链的抗体。因此，改变O 侧链是使它保持领先一步于宿主防卫系统的一种办法。

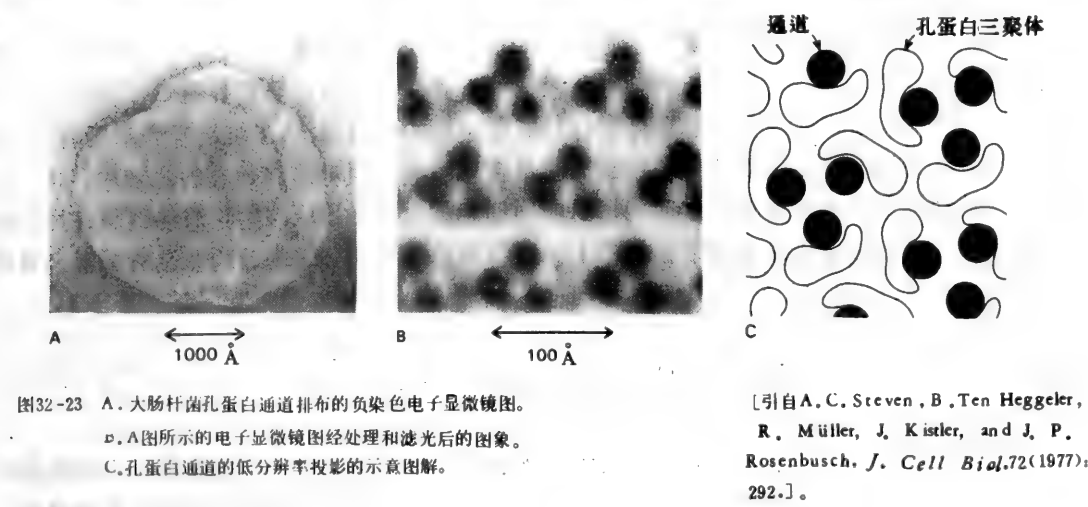
O 侧链改变的遗传信息有时来自革兰氏阴性细菌所含有的温和噬菌体。例如，噬菌体 P 22为细菌提供一个酶基因，这酶能使葡萄糖加到O 侧链的重复四糖单位上（图32-22）。这种类型的改变叫噬菌体转变。在这里，我们看到了细菌基因和病毒基因的相互作用以及它们的共生关系在进化上发挥优势的一个显著例子。

孔蛋白形成通道，使小的极性分子得以穿过外膜

外膜含有大量的（ $\sim 10^5$ ）孔蛋白（porin）分子。这是一种37kdal的跨膜蛋白。孔蛋白三聚体形成通道，使小的极性分子能够迅速扩散穿过外膜（图32-23）。这个通道的直径约为10Å，因而质量大于600道尔顿左右的分子就被排除。疏水分子，无论其体积大小，均不易穿过孔蛋白通道。这一点表明，该通道充满着水，并由极性基团作内衬。因而，孔蛋白通道很适合于小的极性代谢物的透过，如单糖类。某些较大的极性分子则通过特异的运输系统，如麦芽糖运输系统而穿过外膜。麦芽糖（一个二糖）和麦芽三糖穿过孔蛋白通道的扩散太慢了，因此需要一条特殊的途径。此外，还存在着为运输维生素B<sub>12</sub>和铁螯合物的特异运输系统。有些噬菌体通过与这些特异运输体结合而进入细菌。例如，λ噬菌体利用麦芽糖受体。

外膜中最丰富的蛋白质（ $\sim 7 \times 10^5$ 个拷贝）是一个小的仅含五十个氨基酸残基的脂蛋白。这种α螺旋含量高的蛋白质含有三个共价连接的脂肪酸，全部与氨基端半胱氨酸连接。在大约三分之一的脂蛋白分子中，羧端赖氨酸的ε氨基与下层的肽聚糖的羧基键连。于是，脂

蛋白把外膜与肽聚糖层连接在一起，从而对细胞被膜的机械稳定性作出贡献。



新生的外膜蛋白含有将被切除的信号顺序

革兰氏阴性微生物合成的蛋白质可以位于胞液、质膜、周质空间、外膜或细胞外介质中。那么特定的分子如何指向这五个潜在的目的地之一呢？关于这一点，一个十分有益的发现是，外膜的脂蛋白被合成为在氨末端多二十个残基的脂蛋白原（图32-24）。同样，其它以质膜或更外层部位为归宿的蛋白质，也根据存在的信号顺序区别于留在胞液中的蛋白质。由于这些强烈疏水的氨端延伸段的存在，合成运离胞液蛋白质的核糖体与质膜结合。因此，原核生物的分泌过程的最初阶段与真核生物（558 页）十分相象。在此阶段的主要差别是，在原核生物中，合成细胞被膜蛋白的核糖体是结合在质膜上的（图32-25），而在真核生物中，与其相应的成分则结合在内质网上（557 页）。与真核生物一样，当新生链一旦穿过膜屏障，原核生物中的信号顺序立即被肽酶切除。

对细菌突变种的研究有力地支持了信号顺序假说。麦芽糖结合蛋白是一个38 kda1的分子，它参与这种糖的摄



图32-24 脂蛋白原氨端区域的氨基酸顺序。  
该信号顺序含有很多疏水残基(用虚线框示)

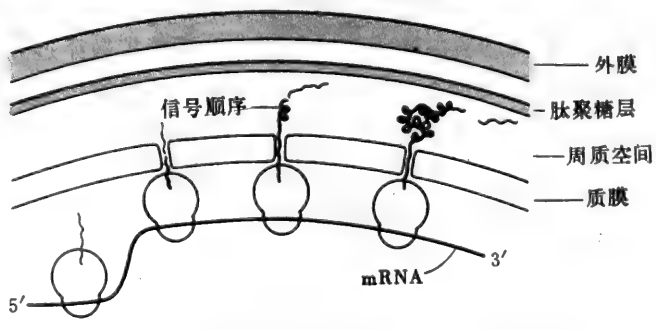


图32-25 不定位于胞液中的原核生物蛋白质，由结合在质膜上的核糖体合成。新生链上的信号顺序（黑粗线）引导核糖体至质膜，并使蛋白质得以跨越此膜。

取。该蛋白在正常情况下位于周质空间。然而，它的前体由于突变而使氨末端发生变化后就改变了成熟蛋白在细胞中的位置。它的信号顺序中的一个疏水氨基酸被带电残基替换，就导致麦芽糖结合蛋白在胞液中的积聚。因此，单一残基的改变能使蛋白质的位置从周质空间转移到胞液中。反过来，正常情况下以胞液为归宿的蛋白质会错误地导向外膜吗？曾将一个外膜中的麦芽糖运载蛋白（也是 $\lambda$ 噬菌体受体）的氨端段的基因与 $\beta$ -半乳糖苷酶基因融合。由这个基因编码的嵌合蛋白出现在外膜中，而不是在通常 $\beta$ -半乳糖苷酶所在的胞液中。这个实验提示，被膜蛋白的地址是由新生链的氨端顺序指定的。显然，原核生物的细胞象真核生物的细胞一样，能把蛋白质移位到指定的靶上。这种拣选过程的分子基础现在是一个激励性的研究领域。

## 概 要

细菌细胞被细胞壁包裹，以保护它们免于渗透性胞溶。在革兰氏阳性细菌里，细胞壁的典型厚度为250Å，由肽聚糖和磷壁酸质组成，而革兰氏阴性细菌的细胞表面则要复杂得多。细胞壁是一个巨大的袋状大分子。在金黄色葡萄球菌中肽聚糖由三个重复单位组成：NAG-NAM, D和L残基组成的四肽和五聚甘氨酸链。五聚甘氨酸单位将不同的多糖链交联起来。UDP-NAG和UDP-NAM是肽聚糖生物合成中的活化糖，该合成分五个阶段进行。第一阶段，当NAM与UDP连接在一起时，一个肽单位被接在NAM上。第二阶段，NAM-肽转移到载体脂上。第三阶段，NAG和五聚甘氨酸桥加到NAM-肽单位上。第四阶段，NAG-NAM-肽单位从载体脂转移到生长着的多糖链上。第五阶段，一条链上的五聚甘氨酸桥的氨基与另一条链末端的D-Ala-D-Ala的肽键作用形成交联。

青霉素的杀菌作用在于抑制细胞壁的合成。青霉素与酰基-D-Ala-D-Ala相象，并含有高活性肽键。它不可逆地抑制糖肽转肽酶，从而阻止肽聚糖的交联。有些细菌对青霉素有抗性，这是因为它们含有青霉素酶，该酶将青霉素水解成失活的形式。

革兰氏阴性细胞与革兰氏阳性细胞不同，它的肽聚糖层外面有一层外膜。而且，在质膜和肽聚糖层之间还有周质空间。外膜含有很有特色的脂多糖。这些亲水脂分子由固定在外膜外叶上的脂A区域和指向外侧的核心寡聚糖及O侧链区域构成。含稀有糖类的O侧链是通过连在载体脂上的四聚糖单位的聚合作用装配而成的。O侧链的多样性有助于革兰氏阴性细菌避开它们宿主的免疫防卫。小的极性分子能扩散穿过外膜中由孔蛋白形成的含水通道，但疏水分子则不行。孔蛋白是一种跨膜蛋白。特异的运输系统能使较大的分子，诸如麦芽糖和维生素B<sub>12</sub>穿过外膜。这个膜的其它主要蛋白质是一种小的脂蛋白，它把外膜与下面的肽聚糖连结在一起。细胞被膜蛋白质由连接在质膜上的核糖体合成。这些蛋白质的前体含有氨端信号顺序，该信号顺序在移位后即被切除。

## 第33章 免疫球蛋白

到本世纪初，已经发现了免疫反应的许多重要特征。至于人体能获得对疾病的防御能力的知识，则更早得多即已被意识到了。瑟西迪德斯（Thucydides）对公元前430年鼠疫袭击雅典的描述就是一个证明：

如果说足以造成如此大的骚动的原因是能够被发现的话，所有关于它的起源和原因的推测，我均留给别的作者……至于我本人，将只简单地描述它的自然状态，并解释症状，使学生在它一旦再次爆发时，能够辨认它。对此，我能做得较好，因为我本人曾患过这种疾病，并且观察过它在其它患者身上的表现……

而且，从这种九死一生的疾病中康复过来的人还得到了更多的安慰。他们从经验懂得，现在他们自己可以无所畏惧了。因为在同一个人身上不会发生两次——至少不会是致命的了。这些人不仅得到别人的，而且也得到他们自己的庆贺。然而，在这个兴高采烈的时刻，有一半是沉浸在徒劳的幻想之中，他们以为从此以后自己对任何疾病都是安全的了……

瑟西迪德斯在确认防御一切疾病的愿望为空想时，表明他清楚地意识到免疫系统所提供的防御能力的特异性。

### 基本定义

抗体（或免疫球蛋白）是动物为反应外来物质的出现而合成的一种蛋白质。该抗体对诱导它合成的外来物质有特异亲和力。抗原（或免疫原）是能诱导抗体形成的外来大分子。蛋白质、多糖和核酸通常是有效的抗原。抗体的特异性是指向抗原的特定部位，该部位称为抗原决定簇。

外来小分子不刺激抗体的形成。然而，如果将它们与大分子连结则能诱导特异抗体的形

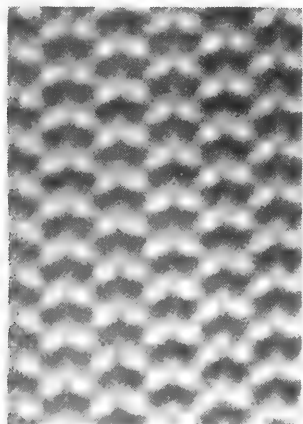


图33-1 抗体分子晶体的电子显微图。[引自L. W. Labaw and D. R. Davies, *J. Ultrastruct. Res.* 40 (1972): 349.]

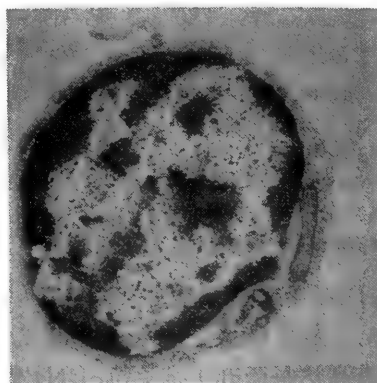


图33-2 B-淋巴细胞的电子显微图。[蒙Lynne Mercer 特许。]

成。那么，该大分子即为与其连结的化学基团的载体，该化学基团被称为半抗原决定簇，单独的外来小分子则被称为半抗原。

抗体分子是由B-淋巴细胞演变出的浆细胞分泌的。另一类淋巴细胞，T-淋巴细胞，介导细胞免疫反应，以补充由可溶性抗体分子导致的体液免疫反应。本章将讨论体液免疫反应，因为关于它的分子基础知道得更多一些。然而，必须注意，抗体分子只是识别外来物质并消除它们的分子和细胞的巨大集成网络的一个组份。

## 抗原引起的特异抗体的合成

动物实际上能制造针对任何外来化学基团的特异抗体。二硝基苯基团(DNP)对于诱导抗体的形成特别有效，因此被广泛地用作半抗原决定簇。抗-DNP抗体可以从以下途径得到：

1. 二硝基氟苯与载体蛋白如牛血清清蛋白(BSA)的赖氨酸侧链或它的其它亲核基团反应，使DNP基团与载体蛋白共价结合(图33-3)。

2. 将免疫原(抗原)DNP-BSA注射入兔子体内。兔子血清中抗-DNP抗体的含量在几天后开始升高(图33-4)。这些早期抗体分子属于免疫球蛋白M(IgM)类，质量约为1000kda。

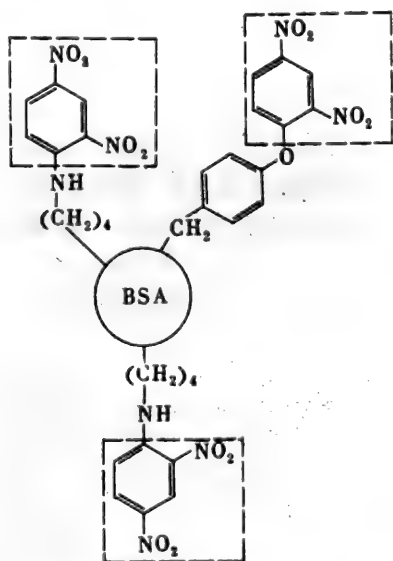


图33-3 二硝基苯基化的牛血清清蛋白(DNP BSA)是一种有效的免疫原。

3. 免疫原注入大约十天后，免疫球蛋白M的量减少，与此同时，一种不同类的抗-DNP抗体的量则增加，该抗体的质量为150kda，称为免疫球蛋白G(IgG)。

4. 注入免疫原大约三周后，免疫球蛋白G类抗-DNP抗体的量达到平顶值。此时给予一剂DNP-BSA促升剂，可使兔血清中

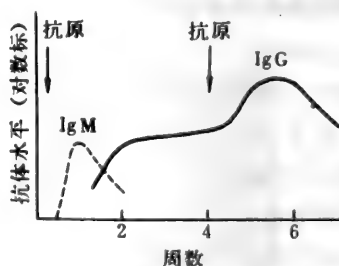


图33-4 免疫后血清中免疫球蛋白M和G(IgM和IgG)出现的动力学。

的抗-DNP抗体的量进一步增加。

5. 从免疫兔子体内将血抽出。所得的血清(因为是在免疫后获得的，故称为抗血清)可含有高达每毫升1毫克抗-DNP抗体。DNP基团对诱导产生大量的特异抗体特别有效。这些抗体几乎全部是免疫球蛋白G类的，这是血清中主要的一类抗体。

6. 下一步是把抗-DNP抗体与其它特异抗体和其它血清蛋白分离。抗-DNP抗体与抗血清中的其它蛋白的不同之处，在于它对DNP基团的亲和力极高。因此，可用亲和层析法

分离。将二硝基苯基与不溶的糖类基质共价结合，组成层析柱。加抗血清使流过这个DNP柱，然后用缓冲液洗脱。抗血清中的大多数蛋白质被洗脱出来，因为它们对DNP基团或糖类支持物只有很小或没有亲和力。相反，抗-DNP抗体紧紧地与柱结合。然后，加入高浓度的二硝基苯酚使抗体释出。这是因为二硝基苯酚能与抗体结合，于是将抗体从不溶的糖类基质的DNP基团上解脱下来。二硝基苯酚和抗-DNP抗体的可溶复合物从层析柱流出。用透析法或离子交换层析法将二硝基苯酚除去，即得到纯化的抗体制剂。

### 抗体的结合部位与酶的活性部位相似

抗体的结合部位（即抗体与抗原结合的部位）在几方面与酶的活性部位相象：

1. 用平衡透析法和光谱技术测定了抗体与半抗原的结合常数。例如，与有色半抗原如DNP衍生物的结合，淬灭了抗体中色氨酸残基的荧光。淬灭程度是抗体结合部位饱和程度的量度。多数半抗原的结合常数在  $K = 10^{-4}$  到  $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  的范围内。因此，典型的标准结合自由能约在  $-6$  到  $-15 \text{ kcal/mol}$  之间，这与酶-底物和酶-辅酶复合物的标准结合自由能范围相同。而且，半抗原-抗体复合物中的结合力也与酶-底物复合物中的结合力相似。静电、氢键和范德华类型的非共价弱相互作用结合起来形成强而特异的结合。

2. 测定了葡聚糖（由葡萄糖残基构成的多糖）的特异抗体与其寡聚物结合的情况。当寡聚物含有六个葡萄糖残基时，结合的亲和力达到最大。在这里，与溶菌酶做一比较是有趣的。溶菌酶活性部位裂口也有能容纳六个糖残基的空间。因此，这个抗葡聚糖抗体的结合部位长约  $25\text{\AA}$ 。

3. 某些半抗原的光谱性质提供了有关抗体结合部位极性的信息。例如，在高极性环境里（如水中），某种萘发出弱的黄色荧光，而在显著的非极性环境中（如己烷中），则发出强烈的蓝色荧光。当这样的萘半抗原与特异抗体结合时，可观察到强烈的蓝色荧光，这说明大部分水已从结合部位上排除。一般说来，抗体的结合部位是个非极性壁龛。该壁龛加强了抗原的结合，原因见前面论及酶-底物相互作用时所作的讨论（83页）。

4. 半抗原的匹配是比较精确的。特异性很高但肯定不是绝对的。半抗原被牢固地结合在结合部位，因此它只具有很小的旋转自由度。各种不同半抗原的结合速率常数高达  $10^8 (\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。这表明，结合步骤是一个受扩散控制的反应。半抗原的结合似乎并不伴有大规模的构象重排。

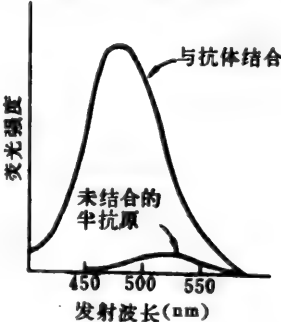


图33-5 当ε-丹磺酰-赖氨酸与抗丹磺酰抗体结合时，这个半抗原的荧光性质发生显著变化。最大发射波长的减小和量子产量的增加，都表明这个半抗原结合在非极性部位。

### 给定特异性的抗体制剂通常是不均一的

抗体在一个非常重要的方面与酶不同。一般大多数给定特异性的抗体，如抗-DNP抗体，并不是单一的分子种类。分析DNP半抗原与抗-DNP抗体制剂的结合情况，揭示出它们具有在大范围内变化的结合亲和力。一些抗体分子与DNP结合的K值为  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ，而另



一些的 $K$ 值为 $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ 。相反，对于特定的底物或辅酶，大多数酶都具有单一的结合常数。而且，抗-DNP抗体或其它具有特定特异性的

抗体在电泳上明显地出现很多区带。相反，酶只表现出单一的或少数几条分散的区带（例如乳酸脱氢酶的同功酶）。

给定特异性的抗体的不均一性是免疫反应的特点。这种不均一性的来源是什么呢？一个重要的发现是，由单个细胞产生的抗体是均一的。但是，不同细胞产生不同种类的抗体。血清中的抗-DNP抗体是很多不同的抗体生成细胞的产物，这就是它的不均一性的原因。

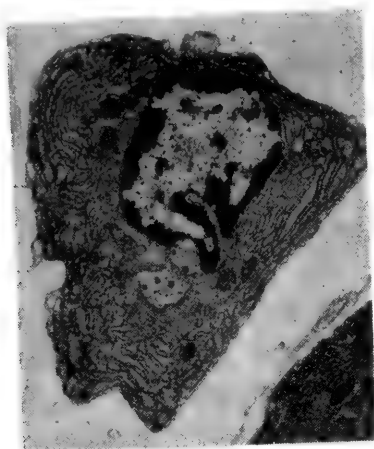


图33-6 浆细胞的电子显微图。这种分泌细胞的粗糙内质网是高度发育的。[蒙Lynne Mercer 特许。]

性的许多片段。1959年，波特，R. (Rodney Porter) 指出，用木瓜蛋白酶进行有限的蛋白水解反应，能把免疫球蛋白G裂解成三个50kda的活性片段。其中二个片段能与抗原结合。它们被称为 $F_{ab}$ （ab表示与抗原结合，F表示片段）。每个 $F_{ab}$ 含有一个与半抗原或抗原结合的部位，它们与半抗原结合是与全分子结合具有一样的亲和力。但是，因为 $F_{ab}$ 是单价的（即只含一个结合部位），它与抗原不形成沉淀，这和完整的免疫球蛋白G抗体分子不同，该抗体分子含有二个等同的抗原结合部位。免疫球蛋白G能与含有一个以上抗原决定簇的抗原形成沉淀。于是形成了伸展的

### 免疫球蛋白G可被酶解成活性片段

免疫球蛋白G的质量约为150kda。研究这样的大蛋白质，一个有成效的方法是把它切成仍保留活

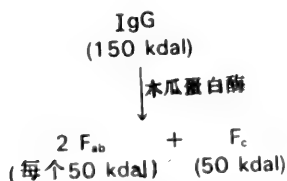


图33-7 蛋白水解作用裂解免疫球蛋白G (IgG)。

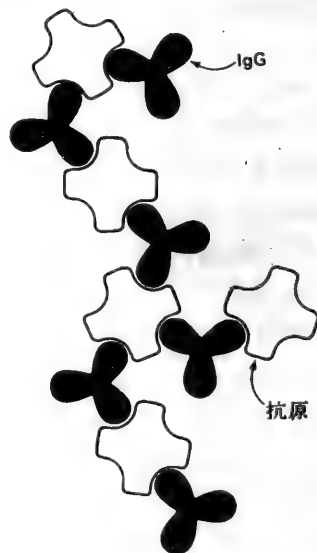


图33-8 IgG（黑色）与抗原（无色）交联而形成网络的图解。

网络，在这个网络里每一个抗体分子与二个或更多个抗原交换，反之亦然（图33-8）。当抗体和抗原以等当量存在时，形成的沉淀量最大。

另一个片段称为 $F_c$ 。（也是50kda），它不与抗原结合，但具有其它重要的生物活性。这个片段能穿过胎盘膜，而 $F_{ab}$ 不能。因此，免疫球蛋白G穿过胎盘膜并到达胚胎循环的能力取决



于F<sub>c</sub>上的特异的胎盘传导部位的存在。在F<sub>c</sub>上还有一个与补体结合的部位。抗体与外来细胞表面上的抗原决定簇的结合，常导致该细胞的溶解。抗体与抗原结合的这种后果被统称为补体的一组蛋白质所介导。这些蛋白质之一与抗原-抗体复合物的结合，触发导致外来细胞溶解的一系列反应。F<sub>c</sub>片段之所以获得这个名字，是因为它易于结晶。这个发现提供了F<sub>c</sub>是均一的事实的一个线索。这与F<sub>ab</sub>不同，F<sub>ab</sub>通常不能结晶，因为它是不均一的。

### 免疫球蛋白G 由L 链和H 链组成

1959年出现的另一个突破是埃德尔曼, G. (Gerald Edelman) 指出免疫球蛋白G 由二种多肽链组成。用巯基乙醇还原分子的二硫键, 同时, 用 6 molL<sup>-1</sup> 脲破坏组成链间的非共价相互作用。所得混合物经层析分析揭示出, 免疫球蛋白G 由25和50kdal的多肽链组成, 它们分别被称为轻(L) 链和重(H) 链。

波特又发现在较温和的状态下, 能使二个H 链和二个L 链重新组成免疫球蛋白G。这些研究使他提出了关于免疫球蛋白G 的亚基结构模型(图33-9), 在这个模型中, 每个L 链由一个二硫键与一个H 链键合。H 链之间至少又有一个二硫键使它们互相键合。因此, 免疫球蛋白G 的亚基结构是L<sub>2</sub>H<sub>2</sub>。

将经木瓜蛋白酶消化得到的片段与这个模型联系比较, 可见木瓜蛋白酶在连接L 链和H 链的二硫键的羧端一侧切开H 链。因此, F<sub>ab</sub> 由完整的L 链和H 链氨端那一半组成, 而F<sub>c</sub> 由二个H 链的羧端那一半组成。包含在F<sub>ab</sub> 中的H 链部分叫做F<sub>d</sub>。

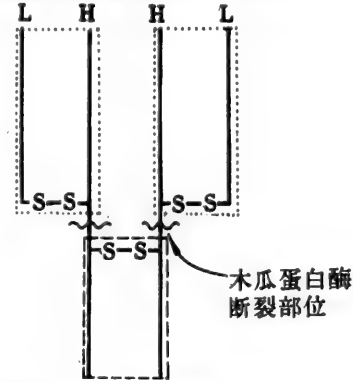


图33-9 IgG 的亚基结构是L<sub>2</sub>H<sub>2</sub>。经木瓜蛋白酶裂解得到F<sub>ab</sub> 单位(虚点框示) 和F<sub>c</sub> 单位(虚线框示)。

### 免疫球蛋白G 是一个柔性的Y 形分子

瓦伦丁, R. (Robin Valentine) 和格林, M. (Michael Green) 所进行的电子显微镜的研究指出, 免疫球蛋白G 具有字母Y 的形状, 同时该研究还指出半抗原结合于F<sub>ab</sub> 单位的末端附近。而且, 完整抗体的F<sub>c</sub> 和二F<sub>ab</sub> 单位通过铰链区连接在一起, 它使F<sub>ab</sub> 之间的夹角能在一个宽的角度范围内迅速改变(图33-10)。这种运动性称为节段柔性, 它使一个抗体上的二个结合部位都能与多价抗原结合, 从而加强抗体-抗原复合物的形成。二个F<sub>ab</sub> 单位尖部的结合部位之间的距离可调整, 以适应抗原的特异决定簇之间的距离(例如, 由很多重复亚基组成的病毒)。当一个抗体的二个结合部位均参与和多价抗原结合时, 它们之间亲和力的典型值是只有一个结合部位参与时的10<sup>4</sup> 倍。节段柔性可能还在从F<sub>ab</sub> 单位到F<sub>c</sub> 单位的信息传递中起作用。

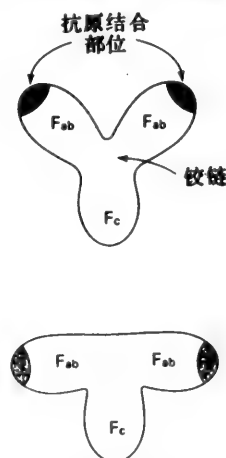


图33-10 免疫球蛋白G 具有字母Y 的形状, 它含有一个铰链区, 使它具有节段柔性。

抗体是通过选择还是通过指令形成的?

酶经过百万年的进化获得了它们的特异性。然而, 在动物血

清中的特异抗体，仅仅在它们曝露于任何外来决定簇几周后便产生了。特异抗体是怎样在这么短的时间里产生的呢？

1. **指令理论** 这是鲍林，L. (Linus Pauling) 在1940年提出的。该理论假定抗原的作用象一个模板，指导新生的抗体链折叠。在这个模型中；给定氨基酸顺序的抗体分子具有形成很多不同特异性结合部位的能力。某种特定特异性的形成取决于折叠时所存在的抗原。指令理论预言，特异抗体不能在相对应的抗原不存在的情况下形成。

2. **选择理论** 这是伯内特，M. (Macfarlane Burnet) 和杰尼，N. (Niels Jerne) 在本世纪五十年代创始的。该理论假定，抗原仅控制产生特异抗体的数量。在这个模型中，特异抗体的结合部位在它遇到抗原以前已完全决定了。

### 指令理论的让位

指令理论预言，抗体如果失去折叠，然后使它在不存在抗原的情况下重折叠起来，将失去它的特异性。这个预言与安芬森，C. (Christian Anfinsen) 实验室所作的有关核糖核酸酶的重折叠实验结果相反。我们记得，去折叠的核糖核酸酶在移去变性剂后，又自发地呈现天然酶所具有的三维结构、特异性和催化活性（25页）。核糖核酸酶重折叠时并不需要底物的存在。这个关于核糖核酸酶的重要实验促使人们为抗体也设计相似的试验（图33-11）。使用抗-DNP抗体的 $F_{ab}$ 片段而不是用完整的抗体分子，因为它的尺寸较小，可使实验简化。用一种非常有效的变性剂， $7 \text{ mol L}^{-1}$  (M) 盐酸胍使 $F_{ab}$ 去折叠。该变性的 $F_{ab}$ 分子对于DNP半抗原没有可检测的亲合性。流体动力学和光学技术表明，变性的 $F_{ab}$ 的构象接近于无规线团。用透析法除去盐酸胍，变性的 $F_{ab}$ 在DNP半抗原不存在的情况下重折叠。惊人的结果是，重折叠的 $F_{ab}$ 对DNP半抗原具有高度亲和性。由于在重折叠过程中没有半抗原存在，因此很明显，结合部位的特异性是抗体的氨基酸顺序的内在性质。这个实验结果与选择理论一致，但与指令理论的关键性预言相矛盾。而且，人们发现，在没有抗原存在的条件下，抗体生成细胞能合成大量抗体。选择理论的实质——抗原影响特异抗体生成的数量，但不影响它的氨基酸顺序或三维结构——现在已牢固地确立了。



图33-11 抗 DNP 抗体的  $F_{ab}$  单位在未加 DNP 半抗原的情况下，经去折叠和重新折叠后与 DNP 结合。这个实验指出特异性是氨基酸顺序的内在性质。

### 骨髓瘤和杂种瘤免疫球蛋白是均一的

在抗原到达以前，特异抗体是怎样形成的？很多年来，抗体制剂的不均一性是解决这一问题的障碍，因为分析抗体分子的混合物相当困难。利用多发性骨髓瘤，一种抗体生成细胞的恶性疾病，克服了这一障碍。在这种癌中，单个淋巴

细胞或浆细胞的转化引起失去控制的细胞分裂。从而，产生极大量的单一类型细胞。因为它们是从同一细胞传下来的，并具有相同的性质，所以它们是一个克隆。这些肿瘤分泌出大量的单一类型的免疫球蛋白。骨髓瘤免疫球蛋白具有正常的结构，属正常的典型免疫球蛋白，每一种都是存在于一个个体中的大量不同抗体的一个均一性样品。骨髓瘤也在小鼠体内发生。这些肿瘤可移植到别的小鼠体内，并在那儿增生。而且，这些抗体生成肿瘤能一代又一代地合成同一种均一抗体。事实上，均一的骨髓瘤免疫球蛋白对于分子免疫学的主要突破作出了贡献。

米尔斯泰因，C. (Cesar Milstein) 和科勒，G. (Georges Köhler) 发现，把抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合，能得到所要求的几乎任何特异性的均一抗体。用一种抗原免疫小鼠，几星期后摘除它的脾脏。取自该脾脏的免疫细胞的混合物在体外与骨髓瘤细胞融合。用不能维持二种亲代系生长的培养基培养这些细胞，从而把杂交细胞挑选出来。这些杂交细胞中的一部分获得骨髓瘤细胞的肿瘤特性，同时它们也合成所要求的特异性抗体。这些杂交瘤细胞和它们的后代无限地大量生产由脾脏的亲本细胞所规定的均一抗体。目前生产很多种这类单克隆抗体作为高度特异的分析试剂。例如；针对某种药物或激素的单克隆抗体可用来检测液体中非常少量的这种分子。

### 每个L链和H链均由一个可变区和一个不变区组成

在很多多发性骨髓瘤患者的尿中出现大量异常蛋白质。这种蛋白质在1847年引起了本斯-琼斯，H. (Henry Bence-Jones) 的注意，因为它有不寻常的溶解性质：它在加热至 50℃ 时沉淀，煮沸时又重新溶解。现在我们知道这种本斯-琼斯 (Bence-Jones) 蛋白是患者的骨髓瘤免疫球蛋白的L链二聚体。它非常适合于作为氨基酸顺序研究的起始材料。

第一个含有约 214 个氨基酸的骨髓瘤L链的全部氨基酸顺序在1965年被测得。这些研究指出，来自不同患者的本斯-琼斯蛋白具有不同的氨基酸顺序。更令人吃惊的是，这些顺序变化均局限在多肽链的氮端的一半。每一个已研究的本斯-琼斯蛋白，在 1 到108位上具有各自独特的氨基酸顺序。相反，许多本斯-琼斯蛋白的顺序自109位以后均是相同的。因此，L链由可变区（残基 1 到108）和不变区（残基109到214）组成（图33-12）。这个值得注意的发现

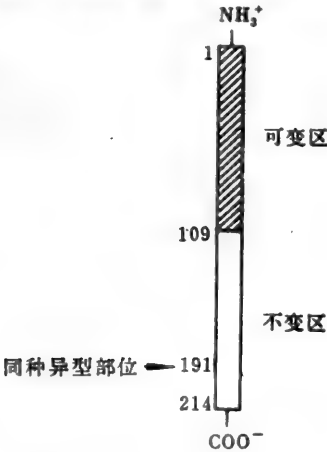


图33-12 免疫球蛋白的轻链由一个可变区和一个不变区组成。

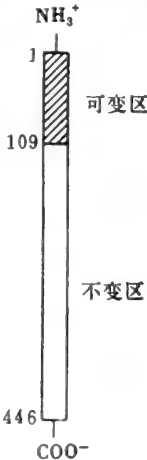


图33-13 IgG的重链也由一个可变区和一个不变区组成。

在蛋白质化学中是没有先例的。

不是所有的L链都具有相同的不变区。事实上，有二类L链存在，分别称为Kappa( $\kappa$ )和lambda( $\lambda$ )，它们表现出很多相似之处。例如，每一类均由214个残基组成，并且含有氨端可变的半段和羧端不变的半段。 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链的每个半段均含有链内二硫环。两种类型的羧端均含有一个半胱氨酸残基，它与H链形成二硫键。而且， $\kappa$ 和 $\lambda$ 链在40%的位置上具有相同的氨基酸残基，这几乎与人类血红蛋白的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链所表现出来的同系程度相同。

所有 $\kappa$ 链均具有相同的不变区，只有残基191或是亮氨酸或是缬氨酸。这种同种异型的差异以经典的孟德尔方式遗传下来。 $\lambda$ 链在191位上也表现出可变性，它或是赖氨酸或是精氨酸。

H链由446个氨基酸残基组成。比较不同的骨髓瘤免疫球蛋白的H链的顺序，看出所有顺序上的变化均位于氨末端的108个残基内。因此，重链象轻链一样，也由可变区(V)和不变区(C)组成。重链可变区的长度与轻链的一样，但是它的不变区长度是轻链的三倍（见图33-13）。

### L链和H链的超变区组成抗原结合部位

如前所述，抗原结合片段F<sub>ab</sub>由全部L链和部分H链组成。这两条链对结合活性的相对贡献是什么？比较很多骨髓瘤蛋白质的氨基酸顺序所得到的早期线索表明，L链和H链的可变性并不是一致的。更确切地说，在L链中有三段，在H链中有四段，它们的可变性比这些链可变区的其它残基大得多（图33-14）。1970年，卡巴特，E. (Elwin Kabat) 提出，是这

些超变区构成了抗原-结合部位。同时，抗体的特异性是由它们的氨基酸残基的性质决定的。

随后，又进行了亲和标记的研究，以检验这个假说。可容易地合成含有活泼基团的半抗原。活泼的半抗原与抗体的结合部位特异地结合，然后，与该蛋白质上的适当的邻近残基形成共价键。例如，抗-DNP抗体可以在它的结合部位上用重氮硝基苯半抗原标记。重氮基是高度活泼性的，能与酪氨酸、组氨酸及赖氨酸残基形成重氮键。用该法修饰的抗体，它的L链和H链均含标记。事实上，被标记的残基位于这些链的超变区内。因此，L链和H链两者的超变残基共同组成抗原结合部位。随后进行的x射线晶体学分析提供了支持这一结论的最直接的证据，我们即将讨论到这一点。

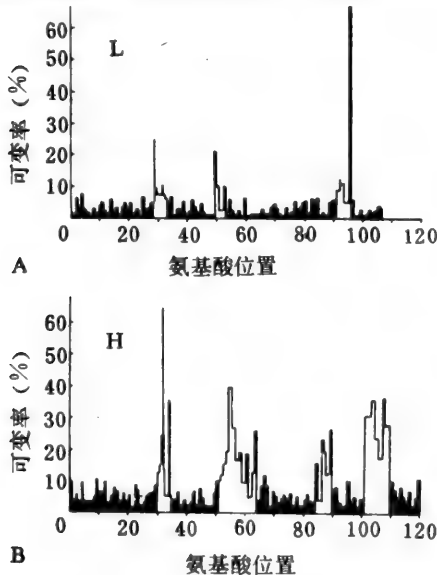
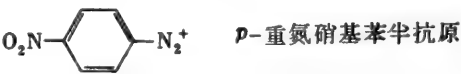


图33-14 (A)轻链和(B)重链中的超变区 以氨基酸顺序的可变性程度作为氨基酸位置的函数制图。

[依据J. D. Capra and A. B. Edmundson, Edmundson, The antibody combining site, Copyright © 1976 by Scientific American, Inc.]



## 可变区和不变区具有不同的作用

轻链和重链的氨端部分含有可变区，它们对抗原的结合负责。氨基酸顺序的变化产生具有不同特异性的结合部位。每条链的其余部分含有不变区，它们介导效应物功能，诸如补体的结合以及转移抗体穿过胎盘膜。具有截然不同特异性的抗体能介导同样的效应物功能。因此，抗体由提供抗原结合特异性的独特顺序区和介导共同性效应物功能的不变区组成。免疫球蛋白的一个显著的结构特点是，在轻链和重链的氨基酸顺序中，可变区和不变区被截然分开。

## 抗体分子折叠成若干个具有同源顺序的密实结构域

免疫球蛋白分子的全部氨基酸顺序是埃德尔曼，G. (Gerald Edelman) 在1968年阐明的。该顺序的最有趣的特点是，在轻链和重链中，链内二硫键的位置具有周期性（图33-15）。而且，免疫球蛋白分子的不同部分的氨基酸顺序有很多相似之处。轻链可变区（ $V_L$ ）与重链可变区（ $V_H$ ）有同源性。此外，重链的不变区（ $C_H$ ）由顺序相似的三等分（ $C_{H1}$ ， $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ ）组成。而且，轻链的不变区（ $C_L$ ）与重链不变区的三个结构域有同源性。

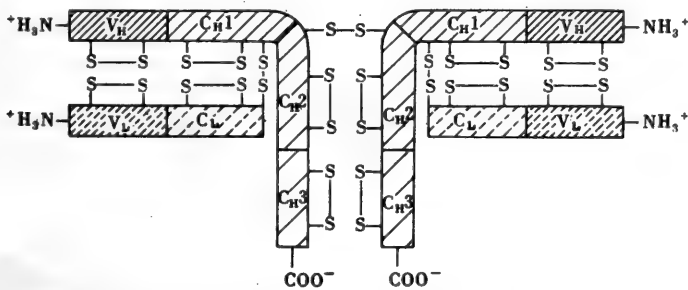


图33-15 IgG的结构。示出二硫键的排布和同源性顺序区。[依据G. M. Edelman. The structure and function of antibodies. Copyright © 1970 by Scientific American, Inc.]

氨基酸顺序的明显的同源现象启示我们，免疫球蛋白被折叠成若干个密实的结构域，每个结构域由至少含一个活性部位的同源区组成，这些活性部位具有各自独特的分子功能（图33-16）。这些结构域在三级结构上似乎也应该彼此相象，因为它们具有相似的氨基酸顺序。x射线晶体学研究已证实了这种结构域假说。人免疫球蛋白的 $F_{ab}$ 片段（与 $F_{ab}$ 片段几乎一样）的三维结构已由波贾克，R. (Roberto Poljak) 解出，分辨率为2.0Å。这个片段由四面体排布的四个球状亚基 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_H1$ 组成，它们具有明显相似的三维结构（图33-17）。这些

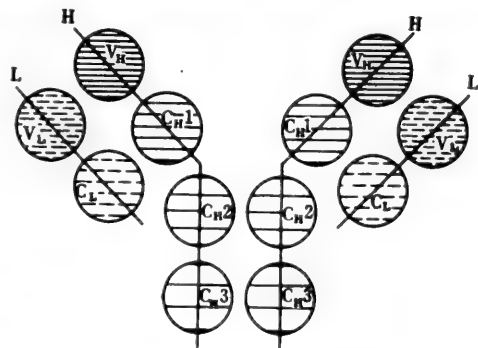


图33-16 描画结构域假说的图解。

结构域的共同结构特点是都有二个反平行 $\beta$ 链宽片层(图33-18)。很多疏水侧链被紧紧地堆积在这些片层之间。这种重复出现的结构模式叫免疫球蛋白折叠。

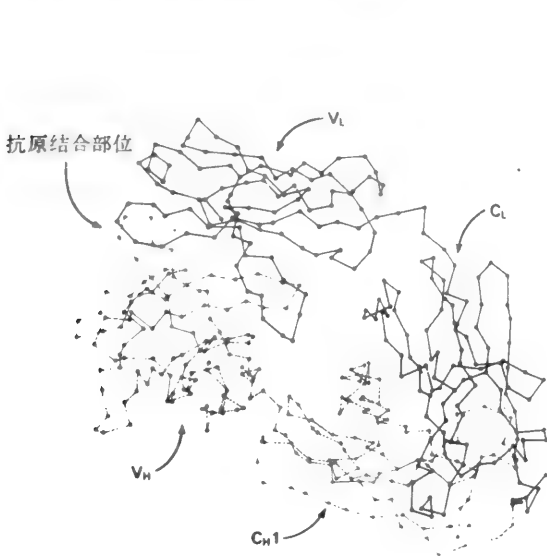


图33-17  $F_{ab}$  单位的 $\alpha$ -碳排布图。[引自R. L. Poljak, L. M. Amzel, H. P. Avey, B. L. Chen, R. P. Phizackerley and F. Saul, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (1973): 3306.]

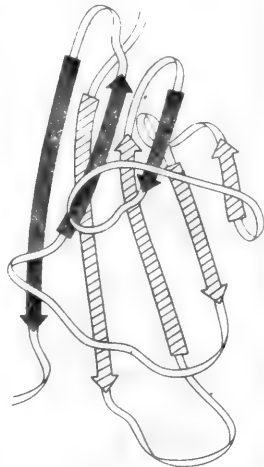


图33-18 在免疫球蛋白中,由二个反平行 $\beta$ 链片层(用黑色和斜线表示)组成的结构域的基本结构模式。[依据J. D. Capra and A. B. Edmundson, *The antibody combining site*. Copyright © 1976 by Scientific American, Inc.]

完整的免疫球蛋白G分子的三维结构由戴维斯, D. (David Davies) 解出。6 Å 电子密度图显示出这个抗体分子是T形的(图33-19)。在 $F_c$ 单位中的结构域,象那些在 $F_{ab}$ 单位中的

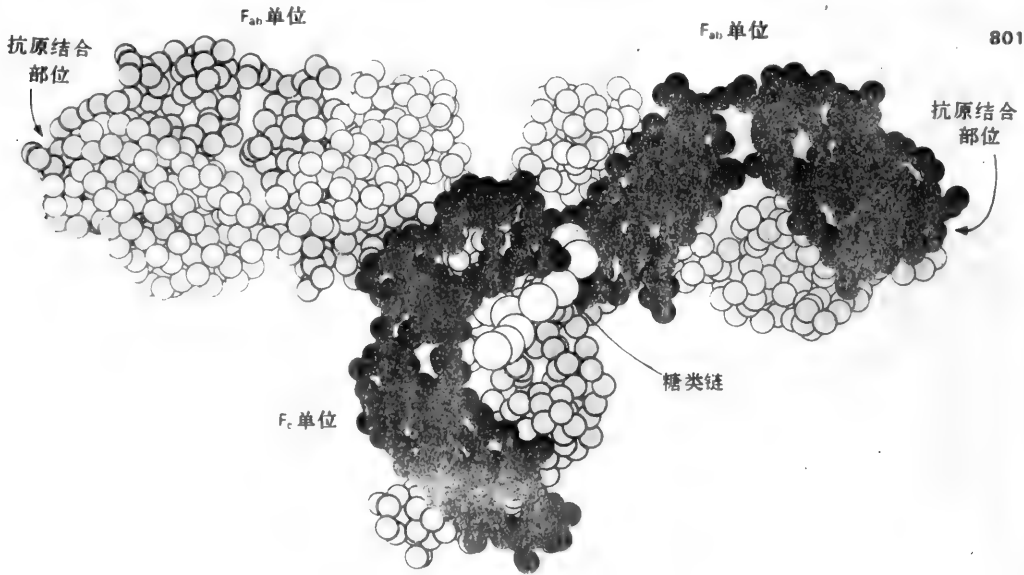


图33-19 1gG 分子的三维结构图解。每个氨基酸残基用一个小球表示。[依据E. W. Silverton, M. A. Navia, and D. R. Davies, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 (1977): 5142.]

结构域一样，表现出特征性的免疫球蛋白折叠。与C<sub>H</sub>2结构域的天冬酰胺残基共价相连的糖，部分坐落在C<sub>H</sub>1和C<sub>H</sub>2结构域之间（图33-19）。这样，糖粗成了F<sub>ab</sub>和F<sub>c</sub>单位之间界面的大部分。比较多种免疫球蛋白和它们的片段中相邻结构域的相对取位，表明结构域之间的多肽链是十分可柔的。

### 抗体结合部位的x射线分析揭示出 一些半抗原是如何结合的

半抗原与F<sub>ab</sub>片段的复合物的x射线晶体学研究，是洞察抗体结合部位的本质和它们的特异性的结构基础的来源。如同根据氨基酸顺序的比较和亲和标记的研究所预言的那样，与抗原结合的部位是由L链和H链两者超变区的残基形成的。可举维生素K<sub>1</sub>衍生物的结合方式为例说明这个重要的结构特点（图33-20）。同样，磷酸胆碱与由五个超变区的残基围成的空腔结合，其中二段在L链，三段在H链（图33-21）。该半抗原与H链残基的相互作用最强烈。磷酸胆碱的带正电荷的三甲基胺基埋在楔形空腔内部，在那里它与二个带负电荷的谷氨酸侧链发生静电相互作用。半抗原的带负电荷的磷酸基与空腔口上的精氨酸残基的带正电的胍基结合。磷酸基还和酪氨酸残基的羟基以及精氨酸侧链的氨基形成氢键。若干范氏相互作用，比如包括色氨酸侧链的那些相互作用，对这个复合物的稳定性也有贡献（图33-21）。

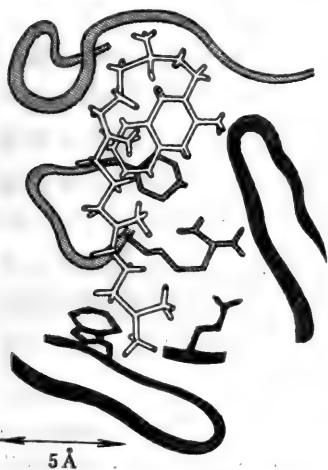


图33-20 维生素K<sub>1</sub>衍生物（无色表示）与抗体结合部位的结合方式。H链的超变区的氨基酸残基用深网表示，L链的则用浅网表示。[依据I. M. Amzel, R. Poljak, F. Saul, J. Varga, and F. Richards. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71 (1974): 1427.]

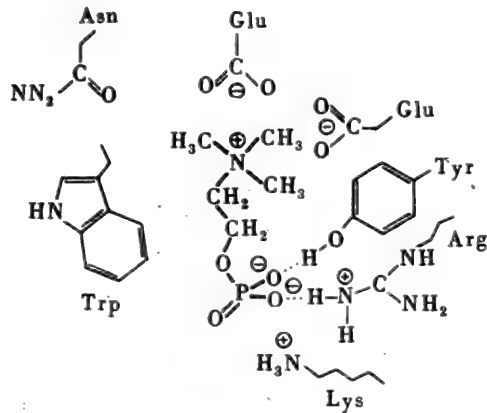


图33-21 磷酸胆碱（粗键表示）与抗体结合部位的结合方式 [依据E. A. Padlan, D. R. Davies, S. Rudikoff, and M. Potter, *Immunochimistry* 13 (1976): 945.]

### 不同类的免疫球蛋白各自具有独特的生物活性

到此为止，我们一直着眼于免疫球蛋白G。实际上，有五类免疫球蛋白（表33-1）。每一类均由重链和轻链组成。不同类的重链不变区各不相同，但轻链均相同，或是λ链或是κ链。

免疫球蛋白G的重链称为 $\gamma$ 链，而免疫球蛋白A、M、D和E的重链则分别称为 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ 。这些各不相同的重链使五类免疫球蛋白具有不同的生物特性。如前所述，免疫球蛋白M (IgM) 是抗原注入后，在血清中出现的第一类抗体，而免疫球蛋白G (IgG) 是血清中的主要抗体。很多年来，由于IgG的电泳和溶解特性，人们一直称它为 $\gamma$ -球蛋白。免疫球蛋白A (IgA) 是在外分泌液，诸如唾液、眼泪、支气管粘液和肠粘液中主要的一类抗体。因此，IgA是抵抗细菌和病毒抗原的第一道防线。免疫球蛋白D (IgD) 和E (IgE) 的有益功能还不知道。但是，在变态反应的介导中，免疫球蛋白E的有害作用已清楚地确定了。

表33-1 各类免疫球蛋白的性质

类别	血清浓度 (mg/ml)	质量(kdal)	沉降系数(s)	轻链	重链	链结构
IgG	12	150	7	$\kappa$ 或 $\lambda$	$\gamma$	$\kappa_2\gamma_2$ 或 $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	180—500	7, 10, 13	$\kappa$ 或 $\lambda$	$\alpha$	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ 或 $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	18—20	$\kappa$ 或 $\lambda$	$\mu$	$(\kappa_2\alpha_2)_5$ 或 $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0.1	175	7	$\kappa$ 或 $\lambda$	$\delta$	$\kappa_2\delta_2$ 或 $\lambda_2\delta_2$
IgE	0.001	200	8	$\kappa$ 或 $\lambda$	$\epsilon$	$\kappa_2\epsilon_2$ 或 $\lambda_2\epsilon_2$

注:  $n = 1, 2$  或  $3$ 。IgM和IgA的寡聚物也含有连接免疫球蛋白分子的J链。分泌物中的IgA还有附加的分泌片段。

### 基因的重复和分化使抗体分子进化

在免疫球蛋白中，结构域间的结构同系性具有重要的进化意义。糜蛋白酶、胰蛋白酶、

弹性蛋白酶和凝血酶在氨基酸顺序上的相似性表明，它们是从共同祖先进化来的 (128页)。同样，免疫球蛋白分子内部的同系性使人联想到，抗体是由基因重复过程及随后的分化过程进化而来的。一个祖先基因可能曾为长度约108个残基的原始抗体编码。这样一个祖先基因可能经重复然后又经分化，从而出现了不同种类的可变区和不变区。埃德蒙森，A. (Allen Edmundson) 提议L链的二聚体是一个原始抗体 (图33-22)。

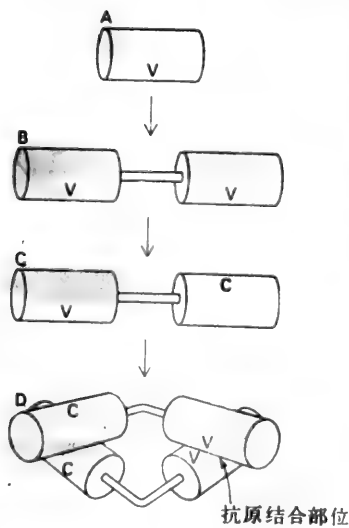


图33-22 提议的原始抗体进化的几个阶段。为约含108个残基的多肽单链(A)编码的基因经重复得到由短线性多肽连接起来的二个等同结构域(B)。重复基因的趋异进化改变了这两个结构域的氨基酸组成，形成了(C)相互有所扭转的可变区和不变区。这些分子的缔合产生(D)具有一个抗原结合部位的原始 $F_0$ 单位。[引自J. D. Capra and A. B. Edmundson, The antibody combining site. Copyright © 1976 by Scientific American, Inc.]

### 可变区和不变区由连接起来的独立基因编码

免疫球蛋白基因是怎样组织和表达的呢?在L链和H链中发现了不同的可变区和不变区，从而产生了这样的可能性，即免疫球蛋白基因与它们的多肽产物一样，具有不同寻常的构造。



如前所述,  $\kappa$  链的不变区除了191位是亮氨酸或缬氨酸外, 其它部分都是相同的。谱系分析表明, 这两种变异体(同种异型)是以经典的孟德尔方式遗传而来的。这一点强烈地暗示, 这些链的不变区的基因只有一个。相反, 遗传的分析表明, 它们的可变区则是由多基因编码的。1965年, 德雷尔, W. (William Dreyer) 和贝内特, C. (Claude Bennett) 提出, 在胚系中多V基因与单一的C基因是分开的。根据他们的模型, 这些V基因中的一个在抗体生成细胞的分化过程中与C基因连起来。那时已知, 如同 $\lambda$ 噬菌体DNA的整合一样, DNA也能被拼接。

对于这个移位假说作出决定性的检验, 还有待于纯免疫球蛋白mRNA的分离和分析复杂的哺乳动物基因组技术的发展。在这方面, 使用限制性酶把大的染色体切成易于分析的特异DNA片段是特别重要的。然后, 使V和C基因与特异于可变区或不变区的mRNA片段杂交, 来分析它们在这些限制性片段上的分布。1976年, 托内加瓦(利根川), S. (Susumu Tonegawa) 用这种方法发现, 在胚胎的(胚系)DNA中, V和C基因相距很远, 可是在抗体生成细胞的DNA中, 它们却紧密相联。就是说, 在淋巴细胞的分化过程中, 免疫球蛋白基因被移位(图33-23)。

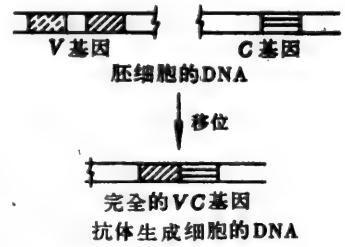


图33-23 在抗体生成细胞的分化过程中, V基因被移到靠近C基因的位置上。

### 多种多样的抗体特异性是怎样产生的?

动物在曝露于任何外来决定簇后的数周之内, 就能合成大量针对该决定簇的特异抗体。一个动物所能制造的不同抗体种类的数目是非常大的, 可能大于百万。我们已经知道, 抗体特异性的结构基础存在于轻链和重链的可变区的氨基酸顺序中。这一点把我们引到这样一个关键性问题: 不同的可变区顺序是怎样产生的? 更准确地说, 我们可以问:

1. 多样性是何时产生的? 是在动物个体的一生中(体细胞的), 还是在进化的过程中(遗传的)?
2. 多样性是怎样产生的? 是由于随机的进化过程; 是由于体细胞的重组; 还是由于体细胞的超突变?

有关骨髓瘤免疫球蛋白的氨基酸顺序的大量资料, 促使免疫学家们着手建立产生多样性的模型。已经提出了三种截然不同的机制:

1. **胚系假说** 此模型假定, 多样性已经存在于胚系中, 在那里有非常大量的抗体的可变区基因( $>10^4$ )。对于可变区中的每一个独特的氨基酸顺序, 在胚系中就有一个与之对应的DNA片段。于是, 这个假说提出, 在进化过程中, 由于随机突变和选择而产生了多样性。
2. **体细胞重组假说** 该模型假设只有很少量的, 约100种左右, 编码抗体的可变区基因。这些相似的但并不相同的基因, 在个体的整个一生中, 在抗体生成细胞内经历着广泛的重组。人们假设交换是在染色体内的。一种似乎合理的计算指出, 十个基因之间的组合可产生 $10^6$ 种不同的氨基酸顺序。
3. **体细胞超突变假说** 该模型假设, 特定亚类可变区的一个单一基因的点突变造成多样性。为了在个体的一生中能产生所要求的多样性, 需要特别高的突变率。有一种提议认为,

这一点是通过抗体生成细胞（或它的前体）中的修补机制实现的，而这种修补机制是专为制造错误设计的。

### 有数百种L链和H链的可变区基因

近年来所发生的DNA技术的革命，使抗体多样性的产生在实验上成为可行。特别是基因克隆和迅速测定长段DNA顺序的方法的发展尤其重要。这些技术的使用在短期内已提供了回答二个关键问题所需的结构信息。这两个问题是：在胚系中存在多少可变区的基因？在抗体生成细胞的分化中，它们的碱基顺序是否变化？

第一个问题的答案是， $\kappa$  轻链可变区 ( $V_{\kappa}$ ) 和重链可变区 ( $V_H$ ) 的基因有几百个。如果有300个 $V_{\kappa}$ 基因和300个 $V_H$ 基因，那么由这些基因编码的L链和H链的组合 ( $300 \times 300$ )，最多能产生  $9 \times 10^4$  种不同的特异性。该计算值的上限， $9 \times 10^4$ ，远小于动物所能产生的不同种抗体的数目，一般认为，该值应大于  $10^6$ 。对于 $\lambda$  轻链，这种不一致甚至更严重，已知该链是由略少于十个 $V_{\lambda}$ 基因编码的。简言之，在胚系中，可变区基因的数目实在太少，以至于不可能是抗体多样性的唯一来源。显然，这种多样性中的一部分必然是在动物的一生中，在它的淋巴细胞的分化过程中产生的。

### J（连接）基因的发现，抗体多样性的另一个来源

阐明多样性产生原因的又一个进步，来自对胚胎细胞和骨髓瘤细胞的克隆化免疫球蛋白基因的碱基顺序测定。这些非常有益的研究是由托内加瓦(利根川)，莱德尔, P. (Philip Leder) 和胡德, L. (Leroy Hood) 进行的。第一个使人惊异的结果是，在胚胎细胞中的V基因并不

为L链和H链的全部可变区编码。这种胚系V基因在氨基酸残基95的密码子上停止，而不是在这个多肽链的可变区末端108位上(图33-24)。那么为可变区的最后十三个残基编码的DNA在哪里呢？在胚胎细胞里，这段DNA出现在意外的位置上：在C基因附近。人们把它称为J基因，这是因为在分化的细胞中，它把V基因和C基因连接起来。事实上，在胚胎细胞中，若干个J基因串联排列于C基因附近(图33-25)。在抗体生成细胞分化时，通过染色体内的重组使一个V基因移位到C基因附近的位置上。明确地说，一个V基因被拼接到一个J基因上，形成一个完整的可变区基因。这些基因的每一个，在重组位置旁边都有一小段回文顺序。这些回文可能是重组过程中的识别元件。

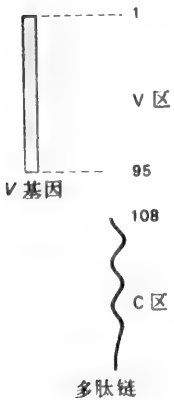


图33-24 从胚胎细胞分离得到的V基因是缩短的，它不为多肽链可变区(V)的最后十三个氨基酸残基编码。



图33-25 前后串联排列的J基因位于C基因附近，J基因为可变区最后一个超变段的一部分编码。

J 基因是抗体多样性的重要贡献者，因为它们为 L 链和 H 链的最后超变片段的一部分编码。在形成连续的 V<sub>κ</sub> 基因时，数百个 V 基因中的任意一个能和五个 J 基因中的任意一个相连。比如，300 种不完全的 V 基因与 5 种 J 基因组合相连，能形成 1,500 种连续的 V 基因。因此，这些基因片段的体细胞重组将已存在于胚系中的多样性放大了。

在 V 基因与 J 基因的连接上选择  
不同框架也有助于多样性

另一个使人惊异的发现是，一套五个 J 基因却在轻链的相应段产生了五种以上的氨基酸顺序。分析氨基酸和碱基顺序所得到的数据又指出，V 基因和 J 基因的重组不是绝对准确的。这些基因之间的重组，可以发生在残基 95 的密码子附近的几个碱基中的任意一个上（图 33-26）。因此，考虑到 V 基因和 J 基因可以略有不同的连接框架进行拼接，更多的多样性就会产生。免疫系统显然以温和的无序为乐事！

特定的淋巴细胞只表达等位基因对中的一个成员。因此，由单一细胞产生的所有抗原结合部位都是一样的。这种有选择的基因表达称为等位排斥，它的结构基础正在被阐明。限制性片段的分析已经表明，一个不完全的 V 基因，只能在一对同源染色体中的一个上与 J 基因正确地连接起来。只有这种恰当重组的免疫球蛋白基因才被表达出来。



图 33-26 J 基因与 V 基因拼接位置的不准确性产生更多的多样性。

初转录本经拼接后形成 L 链和 H 链的 mRNA

κ 轻链的 mRNA 约含 1,250 个碱基（图 33-27）。象其它真

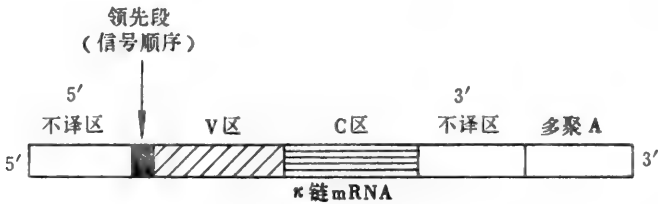


图 33-27 L 链 mRNA 的结构。

核生物的 mRNA 一样，在它的 3' 末端有一个多聚 A 尾，并且在它的 5' 和 3' 末端均有不被翻译的顺序。κ 链 mRNA 的 5' 末端附近的领先顺序为新生链的疏水 N-端段编码。这个信号顺序（图 33-28）将核糖体引向内质网，并使新生免疫球蛋白链得以穿过这层膜进入 ER 腔（557 页）。然后，肽酶在 ER 腔侧切除该信号顺序。轻链的可变区和不变区是由 mRNA 上的紧接着领先顺序的毗邻顺序所编码的。

产生该mRNA的初转录本含有两段间隔顺序（图33-29）。其中之一将领先顺序与可变区顺序的始端分开，另一段则将连接段顺序的远末端与不变区顺序的始端分开。在初转录本的加工过程中，这些间隔顺序被去除。注意到这一点是很有趣的，即J基因携带两种拼接信息，一种是在DNA水平上，将V和J融合，另一种是在RNA水平上，将J和C连接起来。

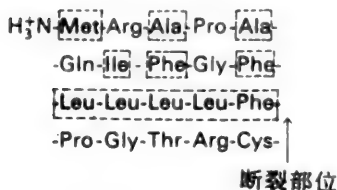


图33-28 新生L链的信号顺序。疏水残基加框表示。

重链的基因结构是怎样的呢？我们记得，H链由四个结构域组成： $V_H$ 、 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ 。含有IgG重链不变区的DNA片段最近被克隆。电子显微镜研究表明， $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ 由独立的DNA片段编码（图33-30）。而且， $C_{H1}$ 和 $C_{H2}$ 之间的铰链区又由

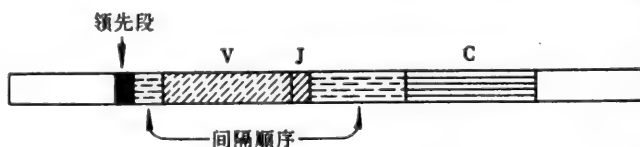


图33-29 L链mRNA的初转录本。

另一段DNA编码。因此，免疫球蛋白的结构域结构（623页）是它们的基本基因构造的反映。拼接使生物在进化过程中，通过为不同功能结构域编码的DNA片段装配产生出新的蛋白质。

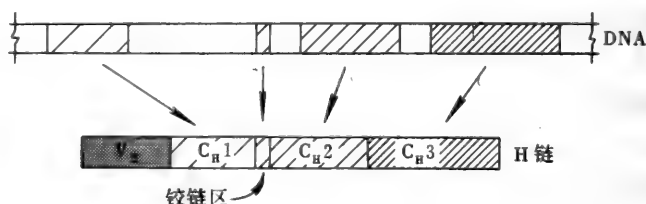


图33-30 重链不变区（C）的三个结构域以及铰链区皆由独立的基因片段编码。

### 通过 $V_H$ 基因的跳跃形成不同类别的抗体

如前所述，有五类免疫球蛋白。抗体生成细胞首先合成IgM，然后合成具有相同特异性的IgG，IgA，IgD或IgE。在这个转换中，轻链是不变的。而且，重链的可变区也保持相同。只有重链的不变区改变。因此，抗体生成细胞分化作用中的这一步称为 $C_H$ 启换（图33-31）。

在小鼠胚胎细胞中，重链 $\mu$ 、 $\gamma$ 和 $\alpha$ 的不变区基因，称为 $C_\mu$ 、 $C_\gamma$ 和 $C_\alpha$ ，它们是相互为邻的（图33-32）。实际上， $\gamma$ 链的不变区有四个基因，这一点与遗传分析所指出的有四个IgG亚类很符合。依次排列的可变区的最后超变段的J基因与 $C_\mu$ 基因靠在一起。 $V_H$ 基因移位到J基因边上，就形成了IgM抗体的重链的完整基因（图33-33）。这种接合使 $V_H$ 、 $J_H$ 和 $C_\mu$ 靠在一起，形成一个功能基因。在领先顺序和可变区的始端之间、在J末端和 $C_\mu$ 始端之间以及在 $C_\mu$ 中的间隔顺序均在初转录本的加工过程中被删去，以形成 $\mu$ 链的mRNA。

对胚胎细胞和骨髓瘤细胞的DNA的限制性水解产物的分析表明， $C_H$  启换发生在DNA水平，而不是RNA水平。比如，从IgM转变到IgA的启换中， $V_H-J_H$  基因从靠近 $C_\mu$  基因的位置移动到靠近 $C_\alpha$  基因的位置上（图33-34）。在这个重组过程中， $C_\mu$  和 $C_\alpha$  之间的基因环伸出去并脱落。一个回文顺序可能将正进行重组的DNA片段排齐。整

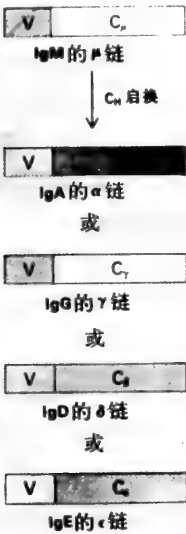


图33-31 不同类免疫球蛋白的合成。 $V_H$  段首先与 $C_\mu$  结合，然后与另一个C段结合，以形成不同类的H链。



图33-32  $\mu$ 、 $\gamma$  和  $\alpha$  链的不变区基因是相互为邻的。 $C_\delta$  和  $C_\epsilon$  基因的位置还不知道。

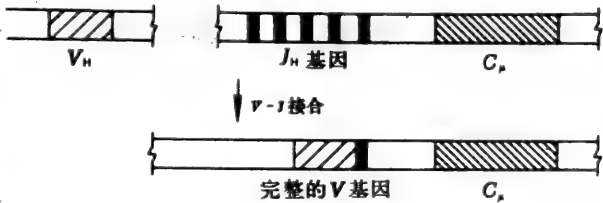


图33-33  $V_H$  与  $J_H$  接合以生成  $\mu$  链的功能基因。

个 $V_H-J_H$  基因的移位说明了这样的事实，即由特定细胞产生的IgA的抗原结合特异性与该细胞发育的较早阶段中所合成的IgM的特异性是相同的。还不清楚在移位作用中，细胞是怎样在几个 $C_H$  基因中选择一个作为靶子的。 $C_H$  启换的生物学意义是，识别结构域（可变结构域）的全部从早期的不变区（ $C_\mu$ ）移动到其它几个不变区之一中去，这些不变区介导不同的效应物功能。

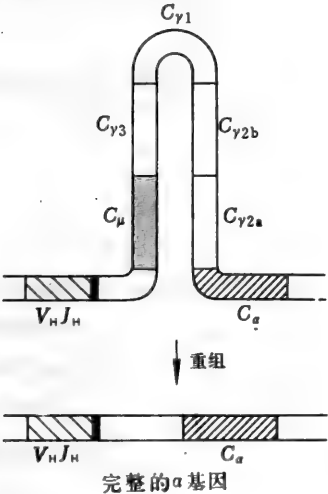


图33-34  $C_H$  启换的结构基础。染色体内重组使 $V_H-J_H$  基因从靠近 $C_\mu$  的位置移到 $C_\alpha$  附近。

### 许多胚系基因的体细胞重组和体细胞突变产生多样性

让我们概括一下抗体多样性的来源。胚系中包含了相当大的可变区基因库。对于 $\kappa$  轻链而言，有数百个（比如300个） $V$  基因和五个 $J$  基因。 $V$  和 $J$  相连接的框架至少有三种。因

此,  $V$  和  $J$  的组合能产生总数为  $300 \times 5 \times 3$ , 即 4,500 种完全的  $V_K$  基因。用相似的方法, 也能得到类似数量的重链种类。4,500 种 L 链与 4,500 种 H 链缔合能产生  $4,500 \times 4,500$ , 即  $2 \times 10^7$  种不同的抗体特异性。这个计算值已大到足以解释动物所能合成的异常多的抗体种类。

如前所述,  $V_\lambda$  基因远少于  $V_K$  基因。实际上, 小鼠似乎只有两个  $V_\lambda$  基因。然而, 已知有多得多的  $V_\lambda$  氨基酸顺序。看起来似乎是体细胞突变造成了  $\lambda$  轻链的大部分多样性。因此, 自然界利用上述三种多样性可能来源 (627 页) 中的每一种——胚系基因库、体细胞重组和体细胞突变——来得到多种多样的抗体, 这对于保护生物抵御外来侵袭是需要的。

## 抗体形成的克隆选择理论

克隆选择理论给出了免疫反应的统一模型。该模型是杰尼, N. (Niels Jerne), 伯内特, M. (Macfarlane Burnet), 塔尔梅奇, D. (David Talmage) 和里德伯格, J. (Joshua Lederberg) 在本世纪五十年代发展起来的。目前这个已确立的理论的基本特征是:

1. 一个抗体生成细胞在它的 DNA 中具有独特碱基顺序, 后者决定它的免疫球蛋白链的氨基酸顺序。抗体的特异性是由它的氨基酸顺序决定的。

2. 单个细胞生产单一种类的抗体。合成特定种类抗体的承诺发生在细胞遇到抗原之前。

3. 每个细胞在它开始成熟时生产少量的特异抗体。这些抗体中的一部分结合到细胞的表面上。如果一个未成熟细胞遇到与它的抗体相应的抗原, 即被杀死。因此, 动物通常不制造对抗自身大分子的抗体——它是自我耐受的。这样的抗体生成细胞在胎儿期即被消除。相反, 一个成熟的细胞若遇到抗原则被激发, 接着, 大量抗体即被合成出来, 同时引发了细胞分裂。这个细胞的后代是克隆。它们与和抗原相遇而受到最初激发的细胞具有相同的基因组成, 因此, 所有这些细胞制造相同特异性的抗体。

4. 当抗原消失后, 克隆倾向于继续存留。这些细胞保留一旦抗原重新出现时被激发的能力, 即提供了免疫记忆。

## 抗体生成细胞的表面含有抗原的受体

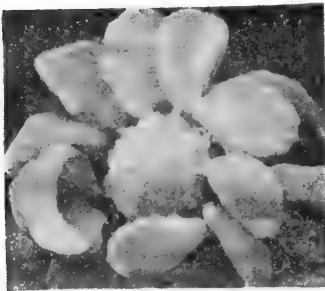


图 33 35 羊红细胞与人的 T 淋巴细胞 (中间) 结合的扫描电子显微照片。这个淋巴细胞的表面含有特异于羊红细胞的一种组份的抗体。[蒙 Dr. Jerry Thornthwaite, Dr. Robert Leif, and Dr. Marilyn Caver 特许]

特异抗体分子位于抗体生成细胞的表面。前体细胞是淋巴细胞。它们分裂得十分缓慢, 除非受到抗原的刺激。然后, 它们演变成浆细胞, 该细胞在合成和分泌抗体方面非常活跃。如果使一个淋巴细胞群体通过含共价结合的二硝基苯 (DNP) 基团的柱, 一小部分即与之结合。这些结合的淋巴细胞合成抗-DNP 抗体, 并且在它们的表面含有这种特异性的抗体分子。其它淋巴细胞则不制造抗-DNP 抗体。

淋巴细胞曝露于特异抗原时是怎样受到激发的呢? 当抗原不存在时, 淋巴细胞表面的抗体分子是随机分布的。抗原的加入具有引人注

目的效应：表面的抗体分子与和它们结合的抗原聚在一起形成帽。这一重新分布后，表面的抗体分子就被吞没，进到细胞内部。成帽作用是一个涉及收缩活性的需能过程。表面抗体-抗原网格的形成导致帽的形成，依次它又刺激细胞分裂。抗原必须是多价的（即含有一个以上特异决定簇），这样它能在淋巴细胞表面交联抗体分子。细胞表面的这些事件与细胞核内的有丝分裂活性之间的联系是激励人们进行研究的领域。

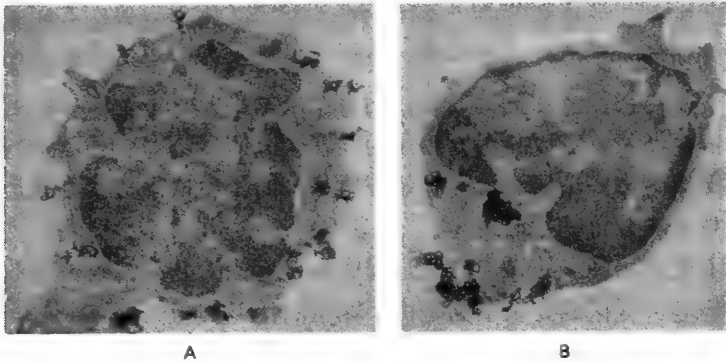


图33-36 显示B-淋巴细胞表面免疫球蛋白的成帽过程的放射线照片。颗粒相当于加到小鼠脾脏B-淋巴细胞上的<sup>125</sup>I-标记的抗-免疫球蛋白抗体。(A)在4℃时，免疫球蛋白分子均匀分布在细胞表面。(B)在37℃保温，标记物聚集到细胞的一端成帽状，然后胞饮作用使它们被吞陷。[蒙Dr. Emil Unanue 特许。]

### 克隆选择的生物学意义

如伯内特所述，克隆选择理论的实质是：

在任何进化的意义上，不存在适合于特定抗原决定簇的结合部位。结合部位的形态是已定的。如果该形态恰巧是适合的，这意思是说，它对给定抗原决定簇的吸附亲和性高于一个定值的话，则在免疫学上有意义的反应就开始了。

在生物学中，选择随机产生的预存模式，并不是一个新课题。实际上，这是达尔文进化理论的核心。注意到这一点很有意思，即指令理论先于选择理论出现：拉马克理论早于达尔文理论，抗原指导折叠早于克隆选择。

杰尼提出，我们应该考虑一下这种可能性，即在神经系统的运行中，比如在记忆中选择机制也起某种作用。实际上，关于知识的指令理论和选择理论在很久以前就有陈述。洛克认为可把大脑比作一张无任何特征的白纸，经验几乎可变化无穷地在这张白纸上绘画。相反，苏格拉底断言，“所有知识均由对预存于大脑中的事物的回想组成。”我们希望你已经熟悉这一章了。

### 概 要

抗体是动物为反应称为抗原或免疫原的外来大分子而合成的一种对该抗原有高度亲和性的蛋白质。外来小分子（半抗原），如果它们接在大分子上，也能诱导特异抗体的形成。抗体的合成是由于选择作用而不是由于指令作用。抗原与已经承担着制造对这种抗原特异的抗体

的淋巴细胞的表面结合。抗原与表面受体的结合触发细胞分裂及大量特异抗体的合成。对抗某特异决定簇的抗体通常是不均一的，因为它们是很多抗体生成细胞的产物。由单一细胞或其克隆生产的抗体是均一的。在血清中有五类抗体，其中免疫球蛋白G是主要的一类。免疫球蛋白M是血清暴露于抗原后在血清中出现的第一类，而免疫球蛋白A是外分泌液中的主要类别。免疫球蛋白D和E的作用还不清楚。

抗体由轻(L)链和重(H)链组成。具有 $L_2H_2$ 亚基结构的免疫球蛋白G含有两个抗原结合部位。免疫球蛋白G能被酶解成二个 $F_{ab}$ 和一个 $F_c$ 碎片，前者结合抗原但不形成沉淀，而后者介导效应物功能，如补体的结合等。比较骨髓瘤免疫球蛋白的氨基酸顺序已揭示出，L链和H链由一可变(V)区(在氨端一侧，约108个残基)和一不变(C)区组成。抗原结合部位是由L链和H链两者的可变区的超变片段的残基构成的。抗体分子折叠成若干个约含108个残基的具有同系顺序的密实结构域。介导效应物功能的不变区结构域可能是由抗原结合(可变的)结构域的重复和分化进化而来的。

可变区和不变区由独立的，在分化过程中连接起来的基因编码。有数百个L链和H链的可变区基因。轻链可变区的完全基因是由不完全的 $V$ 基因与为部分最后的超变段编码的若干个 $J$ (连接)基因之一重组而成的。这种依次串联排列的 $J$ 基因位于 $C$ 基因附近。间隔顺序从初转录本中被除去。这样形成的mRNA除了为免疫球蛋白链的可变区和不变区编码外，还为N-端疏水信号链编码，后者将从新生链上被切除。免疫球蛋白M的 $\mu$ 重链的完全基因也由 $V$ 和 $J$ 基因相连接而形成。当一个完全的 $V_H$ 基因被移位到不同的 $C$ 基因( $C_H$ )时，就形成了另一类的重链(如IgG)。这种基因重排称为 $C_H$ 启换。胚系中相当大量的可变区和连接段基因库存的体细胞重组造成了 $\kappa$ 轻链和重链的多样性。这些基因相连接时的不同框架也对它们的多样性有贡献。体细胞突变对产生多种多样的 $\lambda$ 轻链似乎是重要的。数千种L链与相等数目的H链的缔合能解释一个动物之所以能合成惊人的广泛种类的抗体。



## 第34章 肌肉收缩和细胞游动性

化学键能怎样转变为协调的运动？这是当今分子生物学中最引人注目的问题之一。定向运动发生于细胞分裂时染色体的运动中；噬菌体DNA注入细菌时纤毛和鞭毛的搏动中；分子的主动运载中；蛋白质合成时mRNA的运动中；以及最为明显的在肌肉的收缩中。本章主要讨论脊椎动物的横纹肌收缩的结构基础，这是在这类过程中了解得最透的一种。这个收缩系统由彼此相对滑动的交错蛋白丝组成。收缩能量来自ATP的水解。横纹肌的收缩由 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度控制，而 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度是由肌质网调节的，肌质网是一种特化的膜系统。在平静状态下，它封闭 $\text{Ca}^{2+}$ ，当接收到神经刺激时，又将其释放出来。

### 肌肉由相互作用的粗蛋白丝和细蛋白丝组成

脊椎动物的随意肌在光学显微镜下观察呈条纹状(图34-1)。它由可被电激发的膜包裹着的细胞组成，该膜称为肌纤膜。肌肉细胞含有很多平行的、每根直径约为 $1\mu\text{m}$ 的肌原纤维。肌原纤维浸浴在细胞内液，即肌浆中。肌浆含糖原、ATP、磷酸肌酸和糖酵解酶系。在较为活动的肌肉中可见到很多规则间隔的线粒体。

肌原纤维纵剖面的电子显微照片显示出大

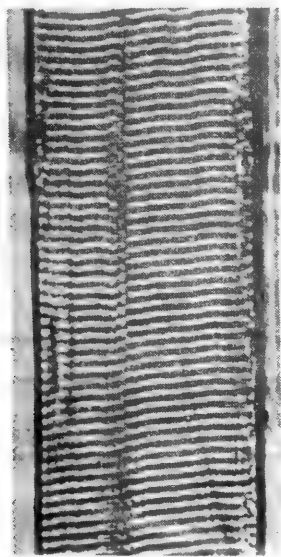


图34-1 直径约为 $50\mu\text{m}$ 的骨骼肌纤维的相差光学显微照片。A带是暗的，I带是亮的。[蒙Dr. Hugh Huxley 特许。]

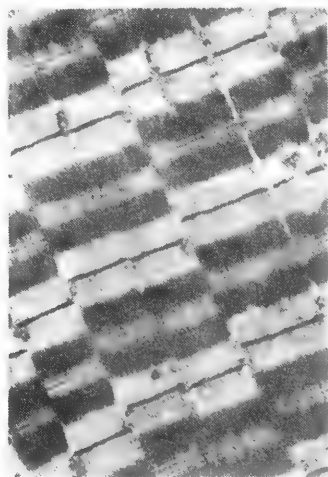


图34-2 骨骼肌纤维纵剖面的电子显微照片。[蒙Dr. Hugh Huxley 特许。]

量的结构细节(图34-2和图34-3)。称为肌小节的功能单位沿纤维轴每 $2.3\mu\text{m}$  ( $23,000\text{\AA}$ ) 重复一次。暗的A带和亮的I带规则地交替出现。A带的中心区称为H区，它的密度比A带的其余部分小。在H区的中心可看到一条暗的M线。I带被一条密度很大的狭窄的Z线等分为二。

肌原纤维横剖面的电子显微照片揭示出肌小节的基本分子设计，表明存在着两类相互作

用的蛋白丝。粗丝的直径约为 $150\text{\AA}$ ，而细丝约为 $70\text{\AA}$ 。粗丝主要含肌球蛋白。细丝含肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白。 $\alpha$ -辅肌动蛋白存在于Z线中，M-蛋白则位于M线。

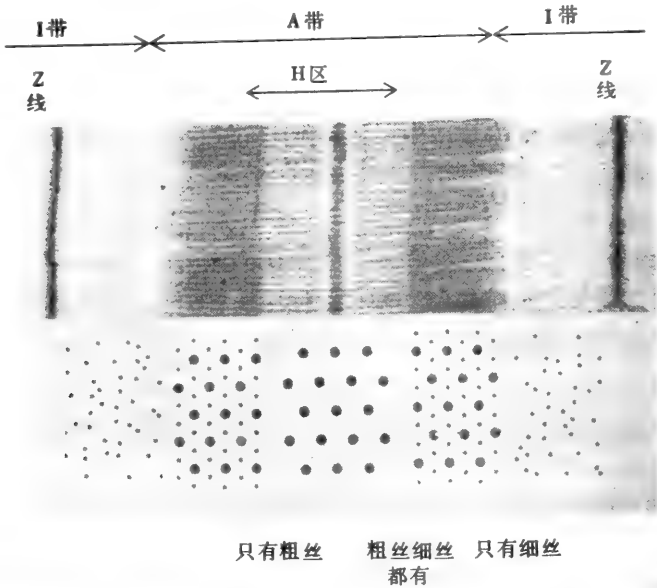


图34-3 骨骼肌原纤维纵剖面的电子显微照片。显微照片下方示出横剖面的图解。〔蒙Dr. Hugh Huxley 特许。〕

I带仅由细丝组成，而在A带的H区中只发现粗丝。在A带的其它部分两种类型的丝均存在。在横剖面中，规则的六边形排列很明显，这表明每根细丝与三根粗丝相邻，同时，每根粗丝被六根细丝所围绕(图34-3)。粗丝和细丝通过横桥相互作用，它们是肌球蛋白分子的结构域。横桥从粗丝上以规则的间隔突出，使粗丝与细丝表面间以 $130\text{\AA}$ 的间隔交联起来(图34-4和图34-5)。事实上，收缩力是由肌球蛋白横桥与细丝中的肌动蛋白单位相互作用而产生的。

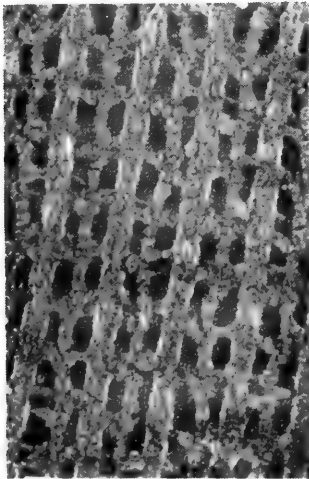


图34-4 粗丝与细丝之间横桥的电子显微照片。〔蒙Dr. John Heuser 特许。〕

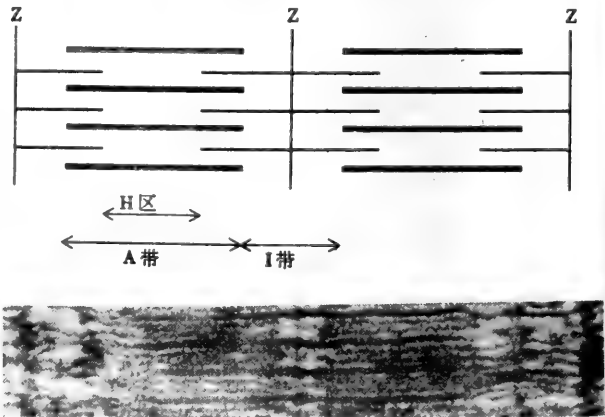


图34-5 横纹肌结构图解，表示出粗丝与细丝的重叠排列。同时示出一极薄纵剖面的相应电子显微照片。〔蒙Dr. Hugh Huxley 特许。〕

## 肌肉收缩时粗丝和细丝相对滑动

肌肉收缩时，其长度可缩短至原长度三分之一。这种缩短是由什么引起的呢？在本世纪50年代，两组研究人员根据x射线，光学显微镜和电子显微镜的研究，分别独立地提出了滑动丝模型。赫克斯利，A. (Andrew Huxley) 和尼德杰克，R. (R. Niedergerke) 以及赫克斯利，H. (Hugh Huxley) 和汉森，J. (Jean Hanson) 提出的这个模型(图34-6)的基本特征是：

1. 在肌肉收缩时，粗丝和细丝的长度不变。
2. 但是，在收缩过程中肌小节的长度缩短，因为两类丝重叠得更多。收缩时，粗丝和细丝相对滑动。

3. 使一类丝移动经过相邻的另一类丝的主动移动过程产生收缩力。



图34-6 滑动丝模型。[引自H. E. Huxley, The mechanism of muscular contraction Copyright © 1965 by Scientific American, Inc.]

测量拉长的、平静的和收缩的肌肉中A带、I带和H区的长度，其结果支持这个模型(图34-6)。

A带长度恒定，意味着粗丝不改变尺寸。Z线到相邻H区边缘之间的距离也是恒定的，这表明细丝也不改变尺寸。相反，在收缩时，因为粗丝和细丝重叠得更多，H区及I带的尺寸均缩短。

## 肌球蛋白形成粗丝、水解ATP并与肌动蛋白结合

肌球蛋白具有三项重要的生物活性。第一，在生理离子强度和pH的溶液中，肌球蛋白分子自发地装配成丝。实际上，粗丝主要由肌球蛋白组成。第二，肌球蛋白是一种酶。1939年，恩格尔哈特，V. (Vladimir Engelhardt) 和柳比莫娃，M. (Militsa Lyubimova) 发现，肌球蛋白是一种ATP酶。



这个反应是驱动肌肉收缩的自由能的直接来源。第三，肌球蛋白与聚合形式的肌动蛋白结合，后者是细丝的主要组份。这种相互作用对产生使粗丝与细丝进行互相相对平移的力确是关键性的。

肌球蛋白是一个非常大的分子(500kda)。它含有二条等同的主链(每条200kda)和四条轻链(每条约20kda)。电子显微照片表明，肌球蛋白由双头球状区与很长的棒相连组成(图34-7和34-8)。这根棒是双股盘绕的 $\alpha$ 螺旋。

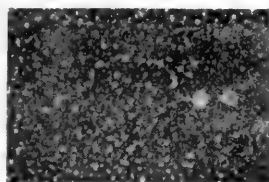


图34-7 肌球蛋白分子的电子显微照片。  
[蒙Dr. Susan Lowey 特许。]

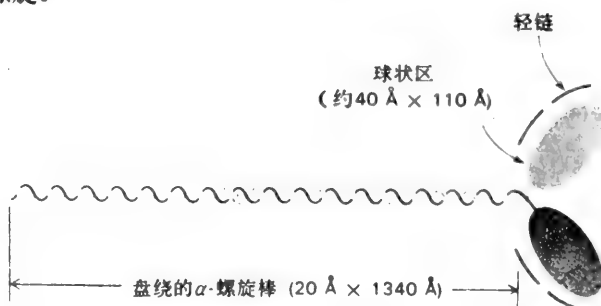


图34-8 肌球蛋白分子的图解。

## 肌球蛋白能被裂解成活性片段

肌球蛋白能被酶切成片段，这些片段仍保留完整分子的某些活性。在免疫球蛋白的讨论中已明显看到这种实验方法是富有成效的（618页）。实际上，肌球蛋白切成活性片段是先出现的。1953年，森特-乔尔吉，A. (Andrew Szent-Györgyi) 指出，肌球蛋白能被胰蛋白酶切成两个片段，称为轻酶解肌球蛋白和重酶解肌球蛋白（图34-9）。

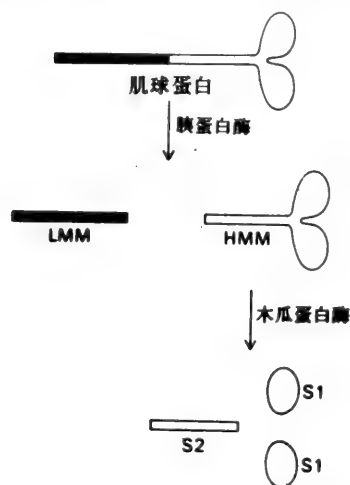


图34-9 肌球蛋白的酶裂解。四个轻链在图中未示出。

轻酶解肌球蛋白（LMM）象肌球蛋白一样，也形成丝。但是，它失去了ATP酶活性，并且不与肌动蛋白结合。电子显微照片指出，LMM是一棒状物，这是LMM溶液粘滞度高的原因。旋光性质指出，它的 $\alpha$ 螺旋含量为90%。而且，LMM纤维的x射线衍射图案在5.1Å处表现出一个强反射，这是盘绕的 $\alpha$ 螺旋的特征反射。组合图象是：LMM是全长为850Å的双股 $\alpha$ 螺旋棒。

重酶解肌球蛋白（HMM）具有完全不同的性质。HMM催化ATP的水解，并与肌动蛋白结合，但是不形成丝。HMM由与双头球状区相连的棒组成（图34-9）。它可以进一步切成二个球状亚片段（称为S1）和一个棒状亚片段（称为S2）。每个S1片段含有一个ATP酶活性部位和一个肌动蛋白结合部位。而且，肌球蛋白的轻链是与S1片段结合。轻链可调节肌球蛋白的ATP酶活性。例如， $\text{Ca}^{2+}$ 对平滑肌的控制是由轻链介导的。

## 肌动蛋白形成能与肌球蛋白结合的丝

肌动蛋白是细丝的主要组分。在低离子强度的溶液中，肌动蛋白是一个42kdal的单体。因为它是球状的，故称为G-肌动蛋白。当离子强度升高到生理水平时，G-肌动蛋白聚合成纤维形成，称为F-肌动蛋白，它与细丝十分相象。在电子显微照片中，F-肌动蛋白看起来象互相盘绕的两股串珠（图34-10）。x射线衍射图案表明，F-肌动蛋白是肌动蛋白单体的螺旋线。该螺旋的直径约为70Å。沿螺旋线轴每间隔360Å，结构重复（图34-11）。

当肌动蛋白溶液加到肌球蛋白溶液中后，形成一种称为肌动球蛋白的复合物。这种复合物的形成伴随着溶液粘滞度的激增。本世纪40年代，森特-乔尔吉，A. (Albert Szent-Györgyi) 演示，粘滞度的增加会由于加入ATP而逆转。这个观察表明，ATP将肌动球蛋白解离成肌动蛋白和肌球蛋白。森特-乔尔吉还制备了肌动球蛋白丝，丝中的分子被流动定向。将这些丝浸浴在含有ATP， $\text{K}^+$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 的溶液中时，得到了一个引人注目的结果。肌动球蛋白丝收缩了，而由肌



图34-10 纯化的F-肌动蛋白丝的电子显微照片。[蒙 Dr. James Spudich 特许。]

球蛋白单独形成的丝不收缩。这些敏锐的实验指出，肌肉收缩的力来源于肌球蛋白、肌动蛋白和ATP的相互作用。

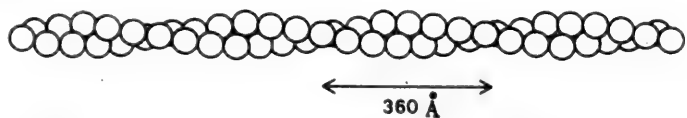


图 34-11 在 F-肌动蛋白中肌动蛋白单体螺旋排列的图解。[依据 Dr. James Spudich 惠赠的图。]

肌动蛋白提高肌球蛋白的ATP酶活性

F-肌动蛋白以化学计算的量显著提高肌球蛋白的ATP酶活性。转换数从 $0.05s^{-1}$ 增加到 $10s^{-1}$ ，是原来的200倍。当肌球蛋白单独作用时，ATP的水解是快的，但产物ADP和 $P_i$ 的释放缓慢。肌动蛋白通过与肌球蛋白-ADP- $P_i$ 复合物的结合，加快了ADP和 $P_i$ 的释放速度(图34-12)，从而增加了肌球蛋白的转换数。然后，肌动球蛋白与ATP结合，导致肌动蛋白与肌球蛋白解离。所得到的ATP-肌球蛋白复合物又为进行另一轮催化循环作好了准备。这些反应需要 $Mg^{2+}$ 。泰勒，E. (Edwin Taylor) 根据快速动力学研究，提出的这个循环反应有一个重要的特点，即肌动蛋白对肌球蛋白和对肌球蛋白-ADP- $P_i$ 复合物具有高亲和性，但对肌球蛋白-ATP复合物只具低亲和性。因此，ATP水解时，肌动蛋白交替地与肌球蛋白结合和脱离。这种ATP所驱动的肌球蛋白与肌动蛋白相互作用的变化，是肌肉收缩中产生力的基本点，对此，我们即将进行讨论。

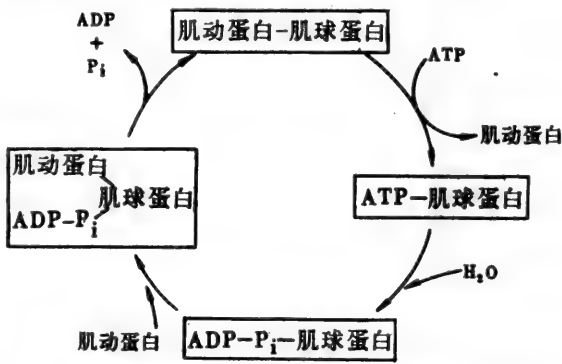


图 34-12 ATP 的水解驱动了肌动蛋白和肌球蛋白循环式地缔合与解离。

粗丝和细丝具有方向性

肌球蛋白和肌动蛋白间复合物的循环式的形成和解离产生了协调的运动，因为这些分子是高度有序装置的组成部分，赫克斯利，H. (Hugh Huxley) 研究了从肌肉中解离出来的完整的丝，又研究了用纯化的肌球蛋白分子形成的合成丝，从而阐明了粗丝中肌球蛋白分子的组织情况。解离的粗丝直径为 $160\text{Å}$ ，长度为 $1.5\mu\text{m}$  ( $15,000\text{Å}$ )。除了沿丝的长方向的中部有一段 $1500\text{Å}$ 的裸区外，横桥以规则的螺旋排列从这根丝中伸出(图34-13)。在合成粗丝中，也明显可见同样的结构特征，这种合成粗丝是通过降低肌球蛋白溶液的离子强度得到的。最短的合成丝长约 $3000\text{Å}$ ，中部含有长为 $1500\text{Å}$ 的裸区。因为在更长的合

成丝中，裸区的尺寸仍是一样的，很明显，粗丝是通过在已装配好的那些分子上再平行地增加分子而延长的。在裸区一侧的肌球蛋白分子指向一方，而在另一侧的则指向相反方向。因此，粗丝本质上是双极性的。

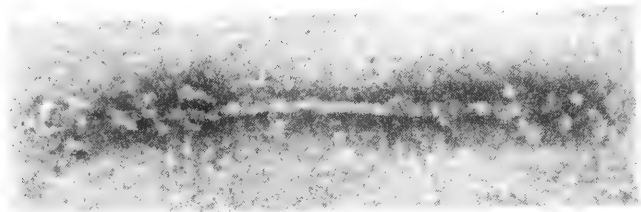


图34-13 重组的粗丝电子显微照片。裸区两边的凸出物均为横桥。[蒙Dr. Hugh Huxley特许。]

象肌球蛋白一样，LMM在低离子强度的溶液中聚集，形成轴向周期为430Å的丝，该周期与完整粗丝中的横桥周期相同。然而，LMM形成的丝是平滑的，这表明，横桥出现在肌球蛋白的HMM段，而肌球蛋白的LMM单位形成粗丝的主干。



图34-14 以HMM的S1部分装饰的F-肌动蛋白丝的电子显微照片“箭头”均指向同一方向。[蒙Dr. James Spudis特许]

细丝也有方向性。如果将肌球蛋白（或HMM，或S1）加到细丝或F-肌动蛋白中去，在电子显微照片中可看到箭头状图案（图34-14）。这些结构被形象化地称为装饰丝。两股装饰丝上的箭状物在整个长度上都指向同一方向。因此，细丝具有固有的方向性，两股都指向同一方向。若干取自肌肉匀浆的细丝制剂含有许多仍和Z线相连的丝。这些丝的重酶解肌球蛋白装饰物表明，所有丝上的箭状物都指向离开Z线的方向。因此，在Z线一侧的所有细丝具有相同的取向，而在相反一侧的细丝具有相反的极性。

粗丝和细丝的极性在肌小节的中部反向

粗丝和细丝的结构极性对协调运动是决定性的。由各个肌动蛋白和肌球蛋白单位相互作用形成的滑动力是

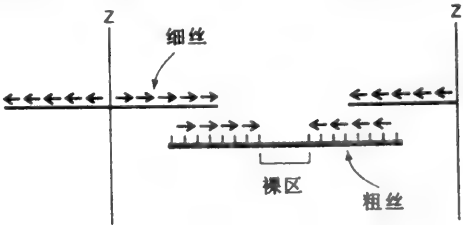


图34-15 在Z线之间的中途，粗丝和细丝的极性反向。

可相加的，这是因为它们的相互作用部位具有相同的相对取向。而且，在Z线之间的中途，这些部位的绝对方向反转（图34-15）。结果是，与粗丝相互作用的两根细丝被相对牵引，使Z线之间的距离缩短（图34-16）。

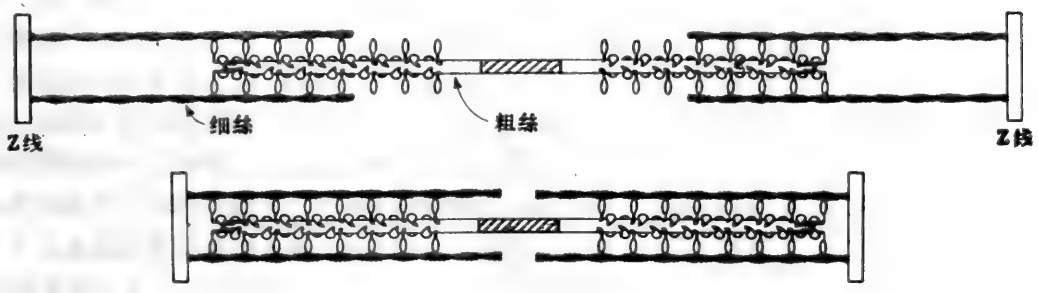


图34-16 在骨骼肌的收缩中，粗丝和细丝相互作用的图解。[依据Dr. James Spudich 惠赠的图。]

### 作功冲程来自与肌动蛋白复合的 肌球蛋白S1头部的偏转

肌球蛋白S1头部与肌动蛋白复合物的周期性地形成扣解离产生了收缩力。即使在单次收缩过程中，也有结合、牵引和分离这样的重复循环发生。目前，正在用生物化学、电子显微镜和x 射线衍射技术研究力的产生机制。这些研究绘出的画面如下：在静止的肌肉中，S1头部与细丝是脱离的（图34-17A）。在这个阶段，S1头部环绕粗丝形成有序的螺旋排列。当肌肉受到刺激时，S1头部离开粗丝，并附着到细丝的肌动蛋白单位上（图34-17B）。下一步是S1头部的方位发生变化，这样，它的长轴与细丝轴形成约45°角（图34-17C）。这个假设的S1头部的偏转可能就是肌肉收缩的作功冲程。S1结构域的这个角度变化通过肌球蛋白的S2单位传递给粗丝。结果，粗丝被牵拉至距离细丝约75Å。最后一步，S1头部从细丝上释放出来（图34-17D）。

现在，让我们将在产生收缩力过程中这些拟议的结构状态与ATP水解的中间物联系起来。在静止态，肌球蛋白含有与其紧密结合的ADP和P<sub>i</sub>（图34-17A）。受刺激时，S1头部以垂直方位与细丝结合（图34-17B）。然后，与S1相结合的ADP和P<sub>i</sub>释放出来，同时，S1头部取倾斜方位（图34-17C）。因此，紧密结合的

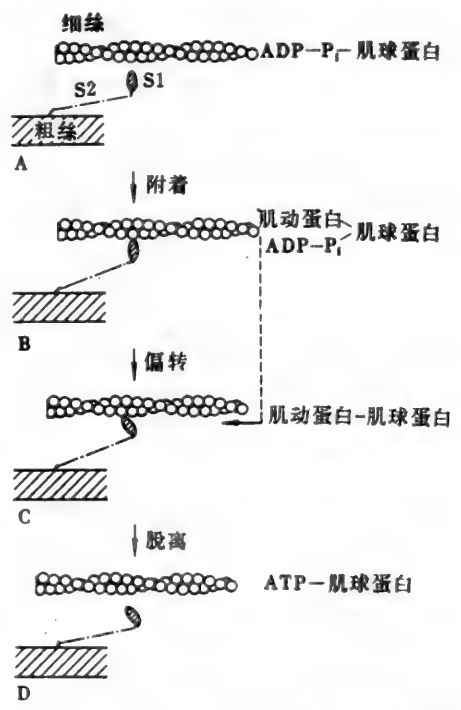


图34-17 产生力的可能机制，通过肌球蛋白的S1单位与肌动蛋白丝相互作用。当与肌动蛋白结合的S1单位的偏转状态改变时，粗丝发生相对于细丝的运动（由B到C的转变）。



ADP和 $P_i$ 的释放驱动了做功冲程。然后，S1头部与ATP结合，使它从细丝上解离(图34-17D)。结果，脱离的S1单位又转向靠近粗丝的垂直方位上。最后，不与肌动蛋白结合的S1所导致的ATP水解完成了这个循环。

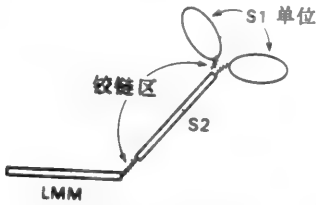


图34-18 在肌球蛋白中的两类铰链区——一类在S1和S2之间，另一类在S2和LMM之间——对允许S1单位在做功冲程中改变它与肌动蛋白的接触是重要的。

肌球蛋白分子含有两类铰链区，使它的S1头部能可逆地与肌动蛋白结合与解离，并在结合状态下改变它们的方位。一类铰链区位于每一个S1头部与S2棒之间，另一类则在肌球蛋白的S2和LMM单位之间(图34-18)。这些铰链区是多肽链的柔性区，易被蛋白水解酶切开。肌球蛋白被酶切成LMM、S2和S1片断，确实就是这一事实的表达，即肌球蛋白是由铰链区连接起来的几个结构域构成的。S2结构域的作用是把张力从与细丝结合

S1传递到粗丝组成部分的LMM结构域去。S1和S2之间的铰链区使S1能以不同方式与肌动蛋白相互作用，即当S1结合着ADP和 $P_i$ 时，它用一种方式与肌动蛋白作用；当ADP和 $P_i$ 被释放时，又以另一种方式与肌动蛋白作用。另一个在S2和LMM之间的铰链区允许S1的位置相对于粗丝有相当大的变化，这样，使S1能准确地与肌动蛋白相互作用。因此，在粗丝与细丝的广阔横向空间内可产生张力。所以，节段柔性在肌肉收缩中起了决定性的作用，如同它在抗体分子中所起的作用一样(619页)。

### 肌钙蛋白和原肌球蛋白 介导钙离子调节肌肉收缩

肌肉收缩的生理调节物是 $Ca^{2+}$ 。江桥，S. (Setsuro Ebashi) 发现， $Ca^{2+}$ 对肌动蛋白和肌球蛋白相互作用的效应是由原肌球蛋白和肌钙蛋白复合物介导的，它们位于细丝中，约占细丝质量的三分之一。原肌球蛋白是双股的 $\alpha$ -螺旋棒，这个长形的70kda蛋白质的排列与细丝的长轴几乎平行(图34-19)。肌钙蛋白是三条多肽链的复合物：TnC (18 kda)，TnI (24kda) 和TnT (37kda)。TnC与钙离子结合，TnI结合于肌动蛋白，TnT则结合于原肌球蛋白。肌钙蛋白复合物位于细丝中，间隔为385Å，该周期是原肌球蛋白的长度决定的。一个肌钙蛋白复合物与一个原肌球蛋白分子结合，调节大约七个肌动蛋白

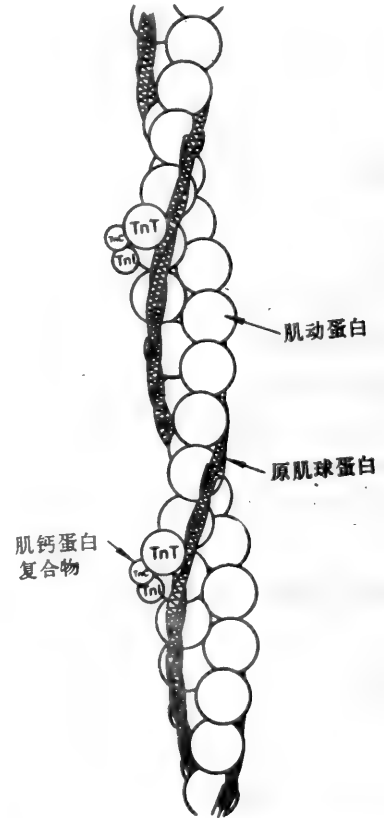
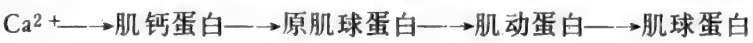


图34-19 静止状态的细丝的拟议模型。原肌球蛋白双螺旋堵塞了收缩状态下肌动蛋白上的与肌球蛋白的S1单位结合的位点。 $Ca^{2+}$ 与肌钙蛋白复合物中的TnC组分的结合迫使原肌球蛋白螺旋移位，从而激活收缩，这又使肌动蛋白上与S1结合的部位暴露出来 [依据C. Cohen, Protein switch of muscle contraction, Copyright ©1975 by Scientific American, Inc.]



单体的活性。

在缺Ca<sup>2+</sup>情况下，肌钙蛋白和原肌球蛋白抑制肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用。在被抑制的细丝中，原肌球蛋白在空间上堵塞肌动蛋白单位上的S<sub>1</sub>结合部位。神经刺激触发肌质网释放Ca<sup>2+</sup>，对此我们即将加以讨论。释放出的Ca<sup>2+</sup>与肌钙蛋白的TnC组份结合，并引起构象的改变，这种变化被传递到原肌球蛋白，又被传递到肌动蛋白。更确切地说，原肌球蛋白移向细丝的长螺旋槽的中心。于是，肌球蛋白分子的S<sub>1</sub>头部就能与细丝的肌动蛋白单位相互作用。收缩力产生了，并伴随着ATP的水解，直到Ca<sup>2+</sup>被移去，原肌球蛋白重新堵塞S<sub>1</sub>头部的接近点。因此，Ca<sup>2+</sup>通过一种变构机制控制肌肉的收缩，该机制中的信息流是：



肌质网控制钙离子流

当神经脉冲到达终板即神经与肌肉的接头处时，肌纤维的外膜成为去极化态。外膜的去极化被T微管传递到肌纤维内部（T代表它们的横向取向）。T微管与极细的通道网络靠得很近，该通道网叫肌质网，它是Ca<sup>2+</sup>的贮库（图34-20）。

在静止状态下，Ca<sup>2+</sup>的主动运输系统将Ca<sup>2+</sup>隔绝在肌质网中（676页）。这个由ATP驱动的泵使静止肌细胞质中的Ca<sup>2+</sup>浓度降低到低于10<sup>-6</sup>mol/L，同时使肌质网内的Ca<sup>2+</sup>浓度增加到高于10<sup>-3</sup>mol/L。称为钙隔绝蛋白的第二种蛋白在网内与Ca<sup>2+</sup>结合。这种高度酸性的44kdal蛋白质与Ca<sup>2+</sup>的结合位点多于四十个。T微管膜的去极化导致Ca<sup>2+</sup>从肌质网囊中突然释放出来。然后，如前所述，释放出来的Ca<sup>2+</sup>与肌钙蛋白复合物的TnC组份结合，从而刺激肌肉收缩。

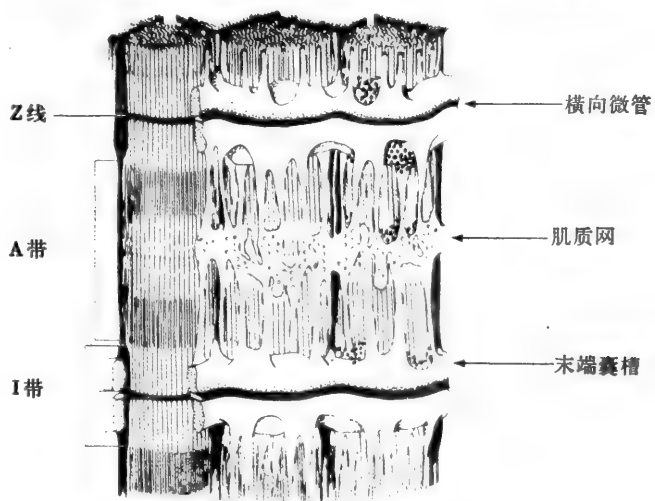
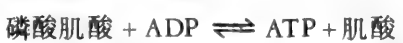


图34-20 肌质网的图解。[依据L.D.Peachey, J. Cell Biol. 25(1965): 222.]

磷酸肌酸是~P的贮存库

肌肉中的ATP含量只够在几分之一秒内维持收缩活性。脊椎动物肌肉中，含有以磷酸肌酸形式存在的高能磷酸基贮库。这个化合物的磷酸基转移势能高于ATP（184页）。肌酸激酶催化磷酸基从磷酸肌酸到ADP的转换，以形成ATP。



一些无脊椎动物使用磷酸精氨酸在肌肉中贮存高能磷酸基。磷酸肌酸和磷酸精氨酸均是磷酸原。



几乎所有的真核细胞中肌动蛋白和肌球蛋白均具有收缩作用

变化比这些来源的肌动蛋白分子的变化大。例如，很多非肌肉细胞的肌球蛋白不容易形成在骨骼肌中所见到的那种类型的粗丝。然而，他们却能形成短的双极性丝。

微丝在细胞中的分布可用免疫荧光显微镜检术显示

多数真核细胞富含肌动蛋白，典型值是占全部细胞蛋白的10%。在多种细胞中，肌动蛋白确是含量最多的蛋白质。非肌肉细胞中，肌球蛋白的含量通常比它们的肌动蛋白含量低十倍。因此，在非肌肉细胞中，肌动蛋白与肌球蛋白的比值远高于肌肉中的比值。

非肌肉细胞中的一些肌动蛋白聚合成微丝（图34-22），它与肌肉的细丝相似。这些直径

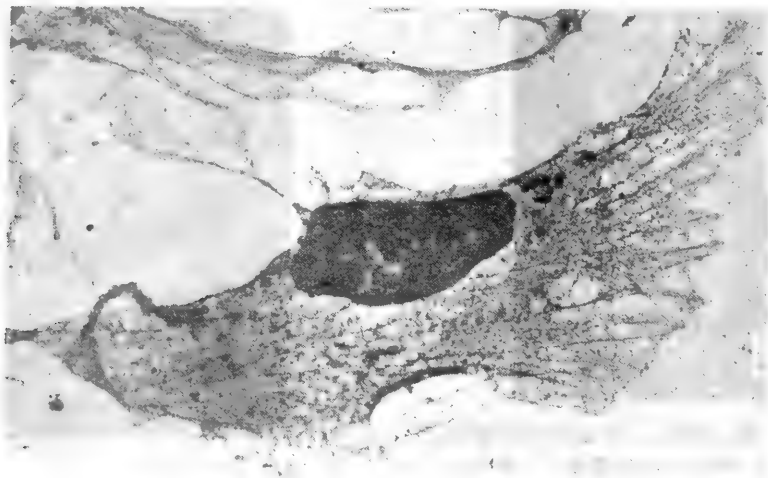


图34-22 电子显微照片显示在鸡胚成纤维细胞的细胞骨架中有很多微丝。[蒙Dr.Susan Brown 特许。]

70Å 的丝在几乎所有真核细胞的电子显微照片中均很明显。当微丝被S1头部装饰时,可看到规则排列的箭头,这表明它们是由肌动蛋白单位组成的,并能与肌球蛋白相互作用(图34-23)。



图34-23 用网柄菌肌球蛋白S1头部装饰网柄菌的F肌动蛋白的电子显微照片。这个箭头图案与用肌肉S1装饰骨骼肌F肌动蛋白的相似。[蒙Dr.James Spudis特许。]



图34-24 培养皿中静止细胞的免疫荧光显微照片，细胞经肌动蛋白的荧光抗体染色。可明显看到微丝的长束。[蒙Dr.Elias Lazarides特许。]

微丝的细胞分布也能用免疫荧光显微镜检术显示出来。用荧光标记物, 比如荧光素, 共价标记对肌动蛋白特异的抗体, 然后加到所培养细胞中去。所得到的荧光显微照片显出明确的丝状排列 (图34-24)。这些荧光束的一部分横跨整个细胞长度。与固态支持物联附的静止细胞中, 这些肌动蛋白丝中的相当一部分取平行于细胞长轴的方向排列。相反, 皱边表现出弥散的荧光, 它们来自肌动蛋白单体或短肌动蛋白丝 (图34-25)。用免疫荧光显微镜检术还研究了其它收缩蛋白的分布。在微丝中还发现有原肌球蛋白 (图34-26), 但是似乎没有肌钙蛋白。钙离子对非肌肉运动的调节与它对肌肉收缩的调节同样重要, 但控制这些过程的方式不同。关

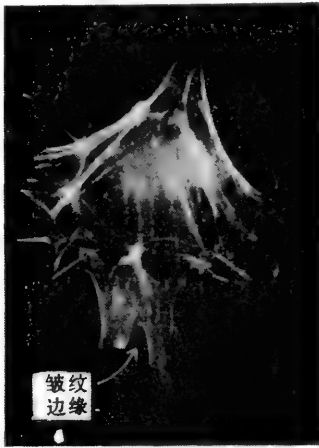


图34-25 在运动着的细胞里, 肌动蛋白丝分布较为分散, 特别是在它的皱边处: [蒙Dr. Elias Lazarides特许。]

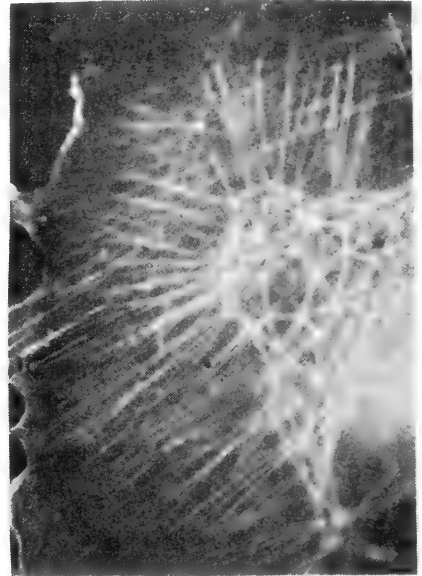


图34-26 在用肌动蛋白的荧光抗体染色的细胞中看到大地测量学的拱顶状结构。[蒙Dr. Elias Lazarides特许。]

于肌球蛋白的分布仍然知道得很少。与肌原纤维Z线的肌动蛋白结合的 $\alpha$ -辅肌动蛋白也存在于非肌肉细胞中。在皱边和那些肌动蛋白丝迅速地装配和解离的位置上,  $\alpha$ -辅肌动蛋白特别重要。 $\alpha$ -辅肌动蛋白的一个可能的作用是把细胞骨架中和其它运动装置中的肌动蛋白丝用桥交联起来。

### 泊靠在膜上的肌动蛋白丝介导肠微绒毛的收缩

肠上皮细胞的微绒毛 (图34-27) 构成非肌肉细胞中的一种最具特色的收缩系统。这种在肠上皮顶端表面的细胞质的突起排布, 根据它在光学显微照片中的形状, 常被称为刷状缘。每一微绒毛含有一束连接在质膜凸出末端的肌动蛋白丝。这些丝还沿微绒毛长度在许多点上通过丝状连接与质膜相联。肌动蛋白丝的核心伸展到细胞表面之下, 进入到称为端网的区域。用去垢剂处理分离的刷状缘可将其质膜除去, 并完整地保留结构的其余部分。引人注目的发现是, 添加 $\text{Ca}^{2+}$ 和ATP能诱导去膜的刷状缘收缩。确切地说, 肌动蛋白丝迅速地插入端网中。

这种运动的结构基础是什么? 用肌球蛋白S1头部装饰微绒毛中的肌动蛋白丝表明, 它们都具有相同的极性 (图34-28)。箭头指向微绒毛尖端的反向, 和肌肉中的装饰细丝箭头从Z

线指向反向一样。换言之，肌动蛋白丝的极性表现为收缩时微绒毛将被拉入细胞。另一个有关的结构发现是，含肌球蛋白的粗丝存在于端网中，可能端网中的双极性的肌球蛋白丝与邻近的微绒毛的肌动蛋白丝相互作用(图 34-28)。在这个模型中，肌动蛋白丝相对于肌球蛋白丝

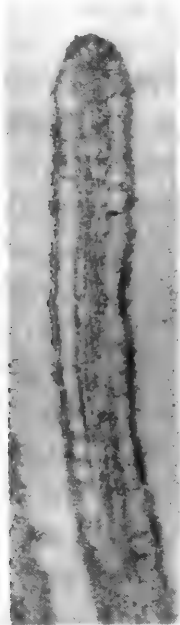


图 34-27 肠上皮的刷状缘的电子显微照片。[引自 M.S. Mooseker and L.G. Tilney, *J. Cell Biol.* 67 (1975): 725.]

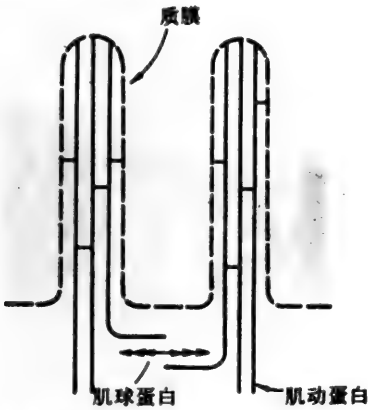


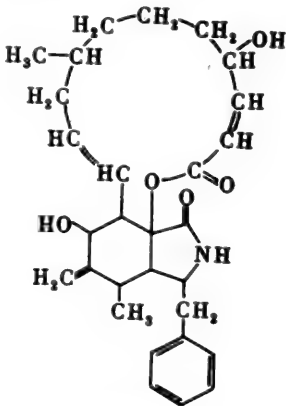
图 34-28 在肠刷状缘微绒毛中肌动蛋白和肌球蛋白的可能布局。[依据 M.S. Mooseker and L.G. Tilney, *J. Cell Biol.* 67 (1975): 725.]

滑动，于是丝束向细胞中心移动。因此，微绒毛缩短可能有助于营养物被细胞吸收。

### 细胞松弛素和鬼笔环肽抑制需肌动蛋白丝翻转的运动

一种来自真菌的生物碱细胞松弛素B可改变真核细胞的形状并抑制它们的多种运动。例如，这种生物碱能抑制成纤维细胞的折皱，神经节轴索的长出，血小板造成的血凝块的收缩以及受精的海胆卵的分裂。电子显微镜的研究指出，细胞松弛素作用于微丝，因为用这种生物碱处理后，微丝从细胞中消失。事实上，细胞松弛素与肌动蛋白丝一个末端的特异作用干扰了该丝的装配。细胞松弛素的抑制作用着重指出了微丝的动态性质。

对鬼笔环肽作用机制的研究，也强调了在细胞运动中微丝不断地装配与拆开的重要性。这种毒剂取自鬼笔鹅膏，这是一种极毒的蘑菇，它还含有一种RNA聚合酶抑制剂 $\alpha$ -鹅膏蕈碱(549页)。鬼笔环肽象细胞松弛素一样，也阻止需微丝翻转的细胞运动。鬼笔环肽与微丝中的肌动蛋白单位结合，并阻止了它们的解聚。于是，微丝实际上被鬼笔环肽有效地锁定。



细胞松弛素B

## 微管参与细胞运动并组成细胞骨架的一部分

至此，我们已考虑了微丝在细胞运动中的作用。现在我们转向微管，这是另一类在几乎所有的真核细胞中都起着结构作用和收缩作用的纤维性部件（图34-29）。微管是中空的圆筒

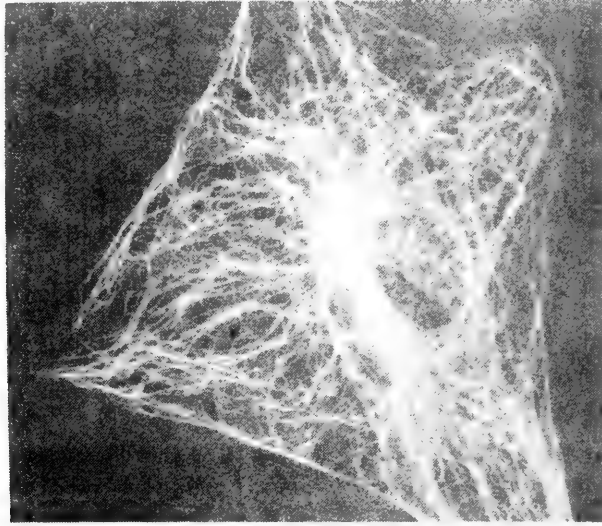


图34-29 成纤维细胞中微管分布的免疫荧光显微照片。[蒙Dr. Klaus Weber 特许。]

形结构，由两种相似的55kda亚基， $\alpha$ -和 $\beta$ -微管蛋白组成。微管的外径约为240Å，这使它明显地区别于微丝（直径70Å）和中间丝（直径100Å，起连接物作用）。微管的刚性外壁是由交替出现的 $\alpha$ -和 $\beta$ -微管蛋白亚基的螺旋排列组成（图34-30）。重复单位是 $\alpha\beta$ 二聚体，这个结构可看成由平行于微管长轴的十三根原丝组成。

装配与拆开发生在微管反向的两端。一种取自秋藏红花的生物碱，秋水仙素，阻止微管的聚合作用，从而抑制依赖于微管功能的细胞过程。例如，由于秋水仙素的作用，细胞分裂停止于中期，因为微管对染色体的运动是必需的。秋水仙素还抑制细胞中多种颗粒的定向运动，所以这种化合物常常能阻止分泌过程。几个世纪以来，秋水仙素一直被用来治疗痛风的急性发作。

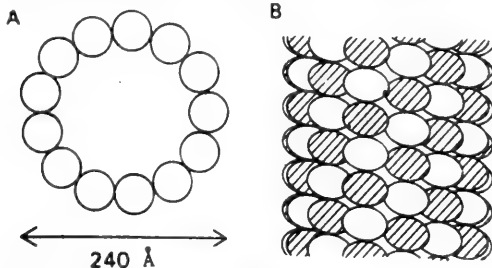
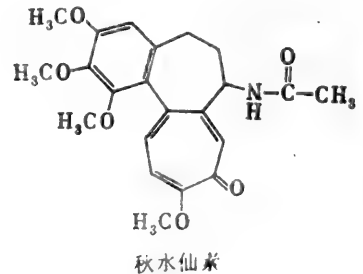


图34-30 微管中微管蛋白亚基的螺旋图案：

(A) 横剖面显示出十三根原丝的排布；

(B)  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的表面网格。

[依据J. A. Snyder and J. R. McIntosh, *Ann. Rev. Biochem.*, 45 (1976): 706.]



# 动蛋白诱导的微管滑动造成纤毛和鞭毛的搏动

微管是真核生物的纤毛和鞭毛的主要组分。这些毛发状细胞器从多种细胞表面上伸出。能动的纤毛就象桨一样，划动平行于细胞表面的液流。例如，呼吸道中排衬着的纤毛的协调搏动，起到了扫除外来颗粒的作用。鞭毛推动游离细胞诸如精子和原生动物。电子显微镜的研究揭示出，几乎所有真核生物的纤毛和鞭毛都具有相同的基本图案：它是一个称为轴纤丝的纤维束，外包一个与质膜连续的膜。实际上，轴纤丝中的纤维是微管。一个由九对微管组成的外周组围绕着两个单体微管（图34-31）。这种重复出现的基本图案叫**9+2排布**。两根中心微管直径为 $240\text{\AA}$ 。外周的九个双体微管，每个外观均象数字8， $370\text{\AA} \times 250\text{\AA}$ （图34-32）。每对中有一个较小，叫**亚纤维A**，它以径向辐条与纤毛的中心鞘相连。每个亚纤维A都有二根外伸臂。在给定的纤毛中所有臂均指向同一方向。用去垢剂然后再用高盐浓度处理纤毛，就可除去它们的外膜，并将一种称为**动蛋白**的ATP酶溶解出来。外纤维保留了它们的九重圆筒形排列，但是无臂。在适当的离子状态下加入动蛋白可恢复臂。因此，**亚纤维A**的动蛋白臂含有ATP酶活性。

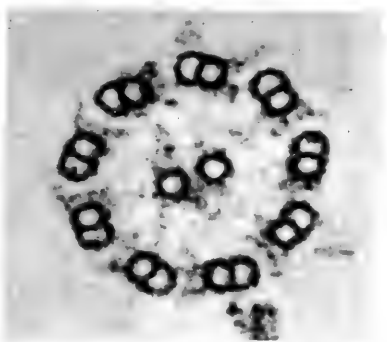


图34-31 鞭毛轴纤丝横剖面的电子显微照片。九个外层双体微管环绕着二个单体微管。  
[蒙Dr. Joel Rosenbaum特许。]

动蛋白分解ATP怎样引起纤毛和鞭毛的搏动呢？萨特，P. (Peter Satir) 和吉本斯，I. (Ian Gibbons) 已指出，轴纤丝的外层双体微管相对滑动造成弯曲。相邻双体微管之间的力是由

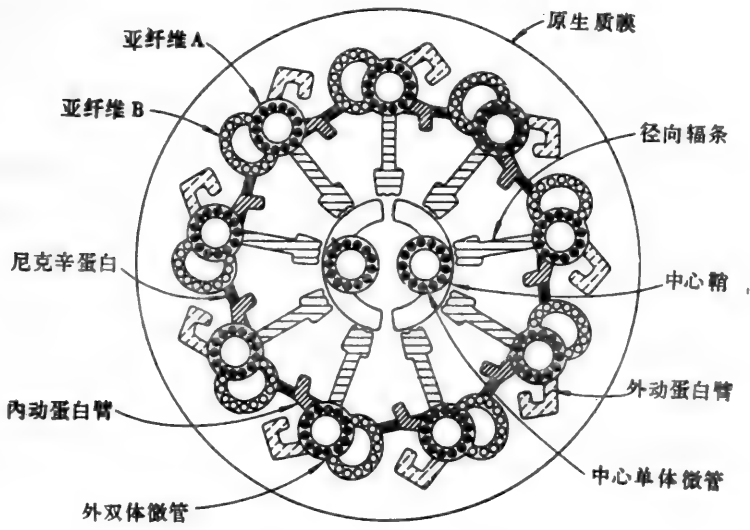


图34-32 轴纤丝的结构图解。

动蛋白横桥产生的。正当ATP正被水解时，一个双体微管的动蛋白臂似乎沿着相邻的双体微管行走，其运动方式与骨骼肌中肌球蛋白横桥在肌动蛋白丝上的运动相似。在完整的纤毛中，径



向辐条抵制这种滑动，使这种运动转变成局部的弯扭。

在一组慢性肺病患者体内发现了缺乏动蛋白的轴纤丝。阿夫泽利厄斯, B. (Bjorn Afzelius)

已指出, 在他们的呼吸道中的纤毛是不能动的。有这种遗传缺陷的男性也是不能生育的, 因为他们的精子也不能运动。最近发现有缺陷的径向辐条是纤毛和鞭毛不能运动的另一个原因。这些临床观察对这些细胞器的拟议的搏动机制提供了进一步的支持。

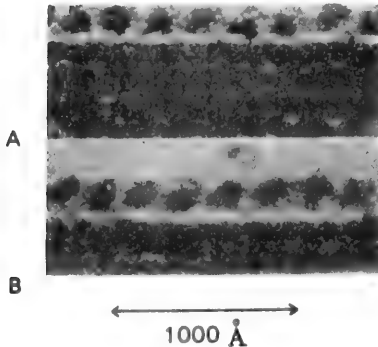


图34-33 动蛋白臂沿微管呈周期性线状排列。(A)完整的轴纤丝和(B)由微管蛋白和动蛋白重组的微管的电子显微照片。[引自L. T. Haimo, B. R. Telzer, and J. L. Rosenbaum, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76 (1979): 5780.]

## 概 要

脊椎动物的横纹肌由两类相互作用的蛋白丝组成。粗丝含有肌球蛋白, 而细丝则含肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白。肌动蛋白使ATP水解, 驱动这些丝进行相互的交错滑动。肌球蛋白是一种非常大的蛋白质 (500kda), 由二条主链和四条轻链构成。主链的盘折使肌球蛋白成为含有二个与长  $\alpha$ -螺旋棒相接的球状区 (S1头部)。球状区和部分棒形成横桥, 后者与肌动蛋白相互作用产生收缩力。肌球蛋白分子的其余部分形成粗丝的支柱。细丝的主要组分肌动蛋白是一种球形蛋白 (42kda), 它们聚合成直径为70Å的丝。细丝和粗丝均有方向性, 它们的方向在Z线之间的中途反转。ATP驱动粗丝的肌球蛋白横桥和细丝的肌动蛋白单位之间所形成的复合物周期性地形成和解离, 该过程使Z线间的距离缩短。作功冲程起源于与肌动蛋白复合的肌球蛋白S1头部的偏转。肌球蛋白分子结构域间的铰链区对于收缩力的产生是重要的。肌肉收缩受 $Ca^{2+}$ 的调节,  $Ca^{2+}$ 的作用由肌钙蛋白和原肌球蛋白所介导。当 $Ca^{2+}$ 含量低时, 这些蛋白质就抑制肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用。神经刺激触发肌质网释放 $Ca^{2+}$ 。钙离子与肌钙蛋白结合, 启发一系列构象的变化, 这种变化使肌动蛋白和肌球蛋白得以相互作用。

肌动蛋白和肌球蛋白是古老的蛋白质, 这一点从它们在粘菌中的存在可以看到。事实上, 这些蛋白质在几乎所有真核细胞中都具有收缩作用。肌动蛋白特别丰富, 它形成直径为70Å的微丝。微丝参与广泛的细胞运动, 例如, 发育中细胞的迁移, 血小板使凝块收缩, 巨噬细胞向受损组织的运动, 等等。肠刷状缘的微绒毛收缩由肌动蛋白丝与双极性的肌球蛋白丝的相互作用所介导, 这种肌球蛋白丝比肌肉中的那种要小, 而且没有那么普遍。细胞松弛素和鬼笔环肽抑制需肌动蛋白丝翻转的细胞运动。细胞松弛素干扰微丝的装配, 而鬼笔环肽则阻止微丝的解离。

真核细胞还含有微管, 它们起着结构上的以及收缩的作用。这些直径为240Å的中空纤维是由微管蛋白亚基组成的。真核生物的纤毛或鞭毛含有二条单体微管及环绕在它们周围的九个双体微管。外周的双体微管由动蛋白交联, 该蛋白质是一种ATP酶。动蛋白诱导的相邻



双体微管的滑动造成纤毛或鞭毛的局部弯扭，并引起它的搏动。秋水仙素阻止微管的多聚作用，从而抑制由微管介导的运动。

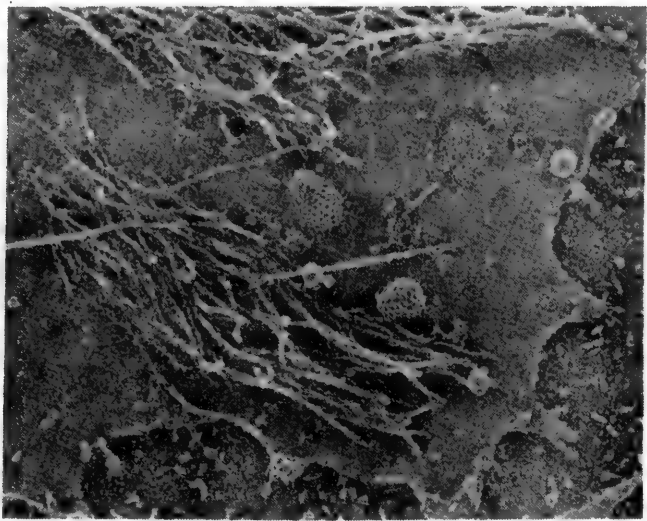


图34-34 成纤维细胞质膜的内表面电子显微照片。成束的肌动蛋白丝(被S1装饰的)和套着的凹坑均很显著。[蒙Dr. John Heuser 特许。]

## 第35章 激素作用

激素是化学信使，它协调多细胞生物体中不同细胞的活性。1904年，贝利斯，W. (William Bayliss) 和斯塔林，E. (Ernest Starling) 首先用激素这个词描述肠促胰液肽的作用，肠促胰液肽是十二指肠分泌的能刺激胰液分泌的一种分子。这个工作的丰硕成果是形成

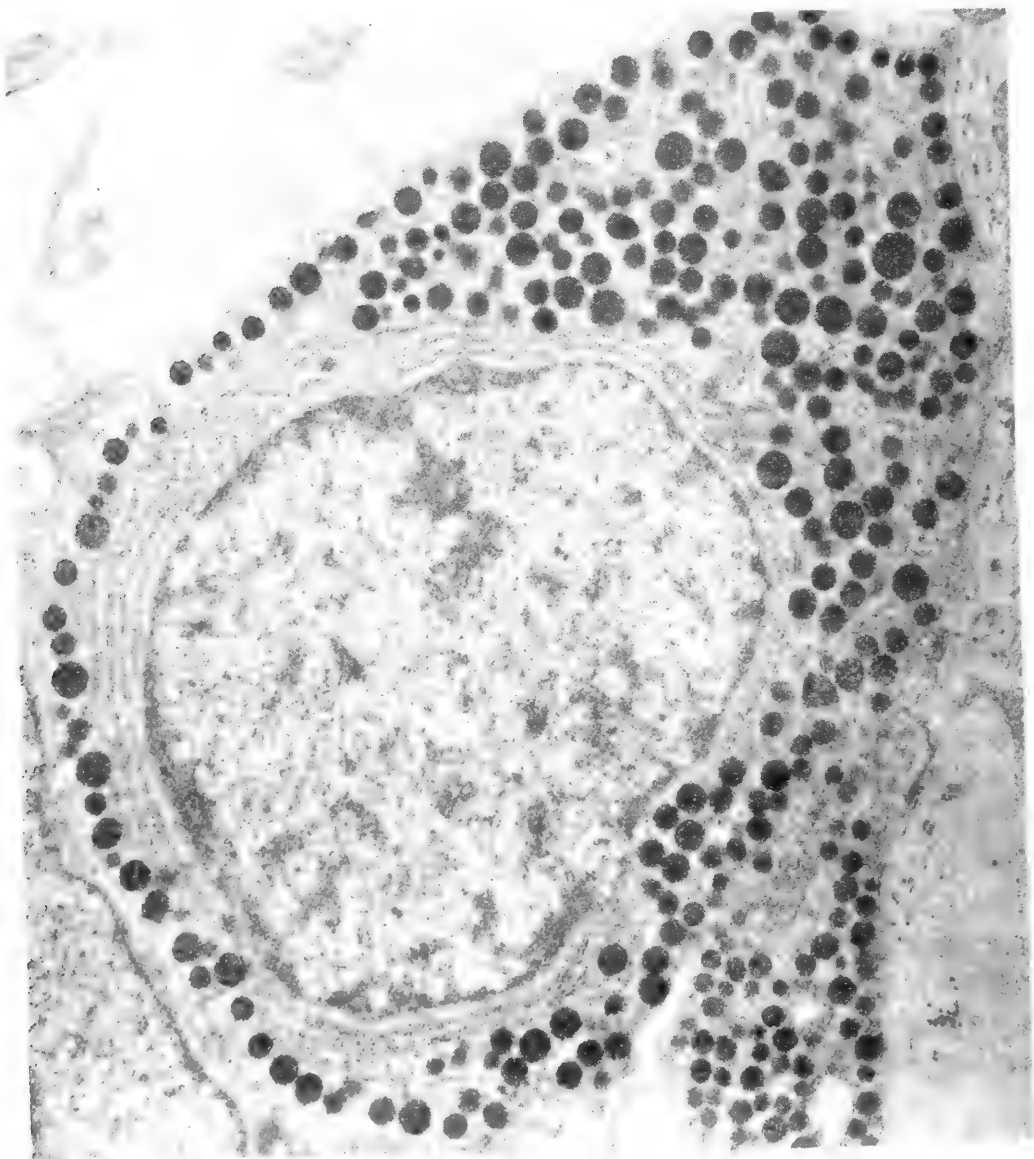


图35-1 脑下垂体中一个产生生长激素的细胞的电子显微照片。生长激素贮存在明显的深色颗粒中。〔蒙Lynne Mercer特许。〕

了一些概念，即：(1)激素是由专门的组织(腺)合成的分子；(2)它们被直接释放进血液，血液将它们运送到它们的作用部位；(3)它们特异地改变某些敏感组织(靶器官或靶细胞)的活力。

激素在化学上有各种不同形式。一些激素是从氨基酸衍生出来的小分子，例如肾上腺素和甲状腺素。另外一些是多肽或蛋白质，例如催产素，胰岛素和促甲状腺激素。第三类激素由类固醇组成，它们是从胆固醇衍生来的。目前正在对某些激素作用的分子基础进行研究。激素通过三种方式发挥它们特异的作用：(1)通过对酶和其他蛋白质合成速率的影响；(2)通过对酶催化速率的影响；(3)通过对细胞膜通透性的改变。有趣的是，至今所知道的激素没有一个不是酶或辅酶。更确切地说，激素是通过调节已经存在的过程而发挥其作用的。

### 多种激素的作用介质——环AMP的发现

萨瑟兰德, E. (Earl Sutherland) 在阐明激素作用的机制方面作出了重大突破。他从五十年代就开始一些有关的研究。最初的目的是想确定肾上腺素和胰高血糖素怎样引起肝脏中糖原分解和产生葡萄糖。萨瑟兰选择这个系统是因为：第一，这些激素对糖原分解所起的作用强并能再现。第二，所起作用在几分钟内发生。第三，肝切片易于大量制备。第四，关于糖原分解的生化知识已经了解得很多(第16章)。实际上，萨瑟兰德是在科里, C. (Carl Cori) 和科里, G. (Gerty Cori) 的实验室开始这些关于肾上腺素和胰高血糖素作用机制的研究的。

一个首要的步骤是确定在糖原转变成葡萄糖的过程中，哪些酶促反应能被这些激素所增强。在<sup>32</sup>P<sub>i</sub>存在下将肝切片保温，然后测定标记了的中间产物，它表明，限制反应速度的是磷酸化酶，而不是葡糖磷酸变位酶或葡萄糖6-磷酸酶。此外，肾上腺素和胰高血糖素能使磷酸化酶活性提高。然而，激活过程的本质还不清楚。之后，萨瑟兰德发现了一个催化有活性的磷酸化酶失活的酶。经证明这个酶是磷酸酶。这使人联想到，磷酸化酶可能通过磷酸化而被激活。这个设想通过在<sup>32</sup>P<sub>i</sub>存在下保温肝切片得到检验。确实发现胰高血糖素和肾上腺素能使<sup>32</sup>P掺入磷酸化酶的速度提高，并正比于它们对于糖原分解的作用。这些研究揭示，磷酸化酶通过磷酸化作用而激活，通过脱磷酸作用而失活。这是第一个通过共价修饰来调节酶的实例。

然后又研究了在打碎的肝细胞制剂中，激素激活磷酸化酶的作用。令人兴奋的发现是，象在肝切片中一样，如入肾上腺素和胰高血糖素导致了磷酸化酶的激活。这个对无细胞匀浆中激素作用的观察是生物化学发展中的一个里程碑。以前还没有观察到在无细胞系统中有特

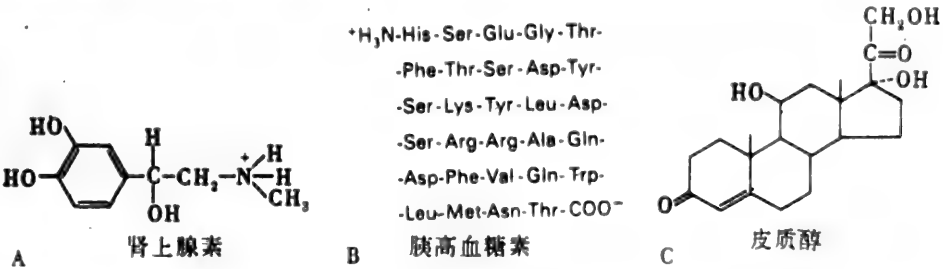
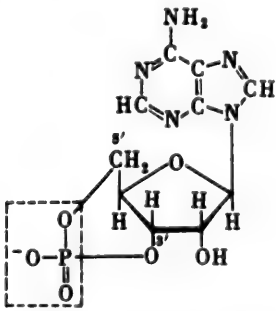


图35 2 三类不同化学本质的激素的例子：(A)肾上腺素(一种氨基酸衍生物)；(B)胰高血糖素(一种多肽)；(C)皮质醇(一种类固醇)。

异的激素效应。过去，一些生物学家一直认为激素仅能对完整的靶细胞起作用。有趣的是，在半个世纪以前一个类似的想法就已经被推翻：那时巴克纳指出，“酵母的无细胞提取物能够发酵”。然而，与糖酵解酶系相反，肾上腺素和胰高血糖素反应系统中不是所有的成分都是可溶性的。实验指出，如果将肝细胞匀浆离心，那么对于这些激素的反应消失。因此，这个激素反应系统的一个必要部分必定存在于颗粒部分。的确，将颗粒部分加回到原来的上清液中后，对激素的反应也会恢复。

颗粒部分包含质膜，从下面的实验中看它的功能更加明显。当颗粒部分与肾上腺素和胰高血糖素共同保温，产生出一个热稳定因子。它加入上清部分时，这个因子激活了磷酸化酶。因此，激素的效应可分为两部分：激素与颗粒部分相互作用产生一个热稳定因子，接着它对于上清液作用可激活磷酸化酶。下一步的挑战是要鉴定这个仅以少量存在的热稳定中间体。化学分析指出，它是一个腺嘌呤核苷酸，但它的性质很不寻常。萨瑟兰德写信给赫佩尔，L. (Leon Heppel) 介绍这个分子，希望他能帮助阐明分子的结构。同时，利普金，D. (David Lipkin) 也写信给赫佩尔，描述了用氢氧化钡处理ATP而产生的一个新的核苷酸。赫佩尔推测，利普金和萨瑟兰德正在研究相同的分子，便促使他们两人互相联系。确实，两个研究人员是在研究相同的分子，这个分子经证明是腺苷3',5'-一磷酸，现在一般称之为环AMP或cAMP。这个偶然发现的另一个附带的成果是能够大量制备环AMP供生物化学研究之用。此外，实验室中从ATP和氢氧化钡合成环AMP，为它的生物合成提出了一个似乎可行的路线。



腺苷3',5'-磷酸  
(环AMP)

环AMP由腺苷酸环化酶合成  
而被磷酸二酯酶降解

环AMP通过腺苷酸环化酶的作用从ATP形成，此酶结合在膜上。



这是个少量吸热的反应，它的 $\Delta G^0'$ 大约为1.6kcal/mol。环AMP的合成由随后焦磷酸的水解作用所驱动。环AMP能被专

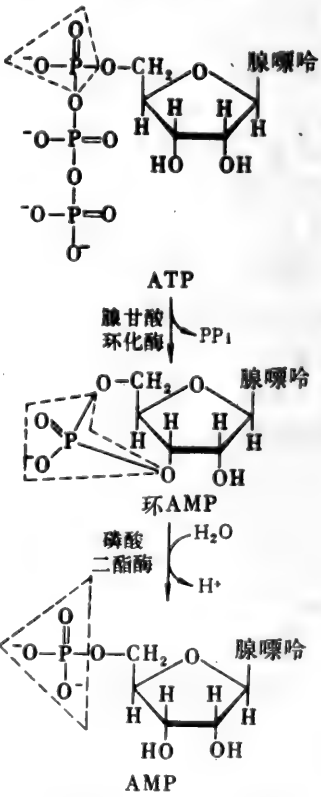


图35-3 酶促环AMP的合成和降解。

一的磷酸二酯酶破坏，此酶将它水解成AMP。

$$\text{环AMP} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{AMP} + \text{H}^+$$

这是个高度放热的反应，它的 $\Delta G^0'$ 大约为 $-12\text{kcal/mol}$ 。在没有磷酸二酯酶存在时，环AMP是非常稳定的化合物。

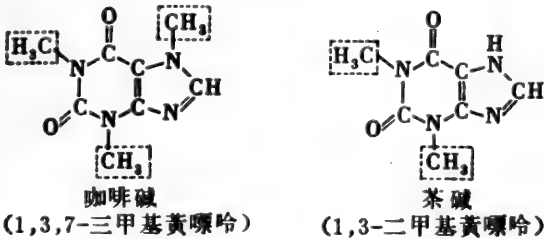
### 环AMP是多种激素作用的第二信使

从萨瑟兰德的工作得出的概念是：环AMP是一些激素作用的第二信使。第一信使是激素本身。这个概念的基本内容是：

1. 细胞的质膜上含有激素的受体。
2. 激素与其在质膜上的专一受体的结合激发了腺苷酸环化酶，此酶也结合在质膜上。
3. 腺苷酸环化酶活性的增高使细胞内环AMP的量增加。
4. 然后，环AMP在细胞内作用，改变一个或更多个过程的速度。

第二信使模型的一个重要特点是：激素不必进入细胞。它的作用是在细胞膜上。在细胞内激素的生物功能由环AMP而不是由激素本身介导。一些实验的判据被用来检验这个概念的正确性：

1. 靶细胞中的腺苷酸环化酶应该被影响此细胞的激素所激发。而不能在靶细胞中引起特征性生物反应的激素也不应提高它的环化酶水平。
2. 从动力学来看，以及从其对激素浓度的相依性来看，靶细胞中环AMP浓度的变化应该与细胞对激素刺激所产生的生物效应成正比。
3. 磷酸二酯酶的抑制剂，例如茶碱和咖啡碱，应与以环AMP为第二信使的激素起增效作用。



4. 加入环AMP或一种有关化合物到靶细胞中当可模拟激素的生物作用。（在实践中不能这样使用环AMP，因为它很难透入细胞。然而，极性较小的环AMP衍生物，例如双丁酰环AMP，却能进入细胞并有活性。）

基于这些判据的实验指出，环AMP除了是肾上腺素和胰高血糖素外，也是其他许多激素的第二信使（表35-1）。环AMP影响着异常广泛的细胞过程。例如：它加快贮存燃料的降

表35-1 利用环AMP作为第二信使的激素

降血钙素 绒毛膜促性腺激素 促肾上腺皮质激素 肾上腺素 促卵泡激素 胰高血糖素 促黄体生成激素	脂肪酸释放激素 促黑素细胞激素 去甲肾上腺素 甲状旁腺激素 促甲状腺激素 后叶加压素
---	---

解, 增加胃粘膜的盐酸分泌, 导致黑色素颗粒的分散, 以及减少血小板的聚集。

### 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白使激素受体 与腺苷酸环化酶偶联

激素(例如肾上腺素或胰高血糖素)与特异的受体结合是怎样导致腺苷酸环化酶分子激活的? 这些激素的结合部位是在质膜的细胞外表面, 而腺苷酸环化酶的催化部位向着胞液。实际上, 激素的结合部位和催化部位是处在不同的蛋白质上。这些蛋白质可以通过将质膜的去垢剂溶液离心而分离开来(图35-4)。腺苷酸环化酶(185kda)如同肾上腺素的受体(75kda)一样, 是一个大的膜本体蛋白。这个激素的受体已知是 $\beta$ -肾上腺素能受体, 因为它能与一系列有药理活性的化合物结合。

激素与特异的受体的结合并不直接激活腺苷酸环化酶。而是由第三个蛋白质作为媒介, 这个蛋白质叫做G蛋白, 因为它能与鸟嘌呤核苷酸结合。这个42kda的调节蛋白有两种形式。这个蛋白质的GTP复合物能激活腺苷酸环化酶, 而它与GDP形成的复合物则不能。通过GTP与结合的GDP交换, G蛋白能从无活性的GDP形式转变成有活性的GTP形式。激素-受体复合物能催化这个GTP-GDP的交换, 而未与激素结合的受体则不能。因此, 信息的传递是从激素的受体到G蛋白, 然后到腺苷酸环化酶(图35-5)。

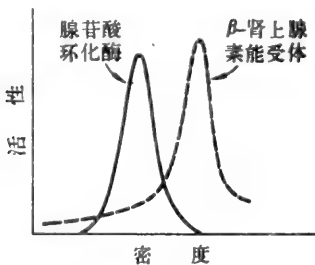


图35-4 借助蔗糖密度梯度离心法, 从用去垢剂溶解的质膜中将腺苷酸环化酶与 $\beta$ -肾上腺素能受体分开。[依据T. Haga, K. Haga, and A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* 252(1977): 5776.]

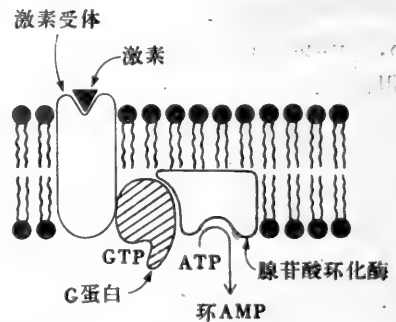


图35-5 激素与其特异的受体结合从而激活腺苷酸环化酶过程中信息的流向。G蛋白在腺苷酸环化酶激活和失活中都起着关键作用。

腺苷酸环化酶的激活作用是如何关闭的呢? G蛋白还具有另一个性质, 这个性质使它作为激素受体和腺苷酸环化酶之间传递信息的中间体。结合于G蛋白的GTP缓慢地水解为GDP。换句话说, G蛋白是一个GTP酶。因此, 这个调节蛋白有一个引起失活作用的内部装置。以GTP状态存在的G蛋白的比例, 即活性形式的腺苷酸环化酶的比例, 取决于GTP与GDP交换的速率与结合的GTP水解速率的对比。G蛋白与已经占据的激素受体的结合显著地增加GTP-GDP交换的速率。结果是, 当激素水平低时几乎所有的G蛋白以GDP形式存在, 从而几乎所有的腺苷酸环化酶是无活性的。在某些类型的细胞中, 腺苷酸环化酶的激活也取决于 $Ca^{2+}$ 的水平。在那些细胞中激活腺苷酸环化酶除需要GTP形式的G蛋白外还需要一个17kda的蛋白质, 即钙调节蛋白(calmodulin)与 $Ca^{2+}$ 的络合物。目前正在开始阐明控制腺苷酸环化酶的

调节回路。

## 环AMP激活蛋白质激酶

那末，环AMP是如何影响这么多细胞过程的呢？是否这许多作用都有一个共同的因子呢？的确是有的，答案还是来自控制糖原代谢作用的研究，这个代谢曾被轻松地称为环AMP的代谢所。克雷布斯，E. (Edwin Krebs) 和沃尔什，D. (Donal Walsh) 发现：环AMP激活骨骼肌中的蛋白质激酶。这个蛋白质激酶既磷酸化糖原合成酶（使它变为无活性的），也磷酸化磷酸化酶激酶（使它变为有活性的）。这样，环AMP促进肌肉中糖原分解和终止糖原合成（283页）。在肝脏中存在着相似的机制。事实上，环AMP的所有已知的效应都来自于对蛋白质激酶的激活作用。迄今研究过的所有细胞都含有蛋白质激酶，这些蛋白质激酶由浓度为 $10^{-8}\text{mol/L}$ 数量级的环AMP激活。这些激酶通过将蛋白质磷酸化来调节不同细胞中不同蛋白质的活性。

环AMP激活肌肉中蛋白质激酶的机制是有趣的。这个酶包含两种亚基：一个49kda的调节（R）亚基，它能结合环AMP，和一个38kda的催化（C）亚基。当没有环AMP时，调节和催化亚基形成一个无酶活性的 $R_2C_2$ 复合体。环AMP与每个调节亚基的结合会导致 $R_2C_2$ 复合体解离成一个 $R_2$ 亚基和二C亚基。于是这些游离的催化亚基有了酶促活性。因此，环AMP与调节亚基的结合解除了调节亚基对催化亚基的抑制。环AMP起了一个变构效应物的作用。在蛋白质激酶中存在明显不同的调节和催化亚基使人想起天冬氨酸转氨甲酰酶的亚基结构（404页）。

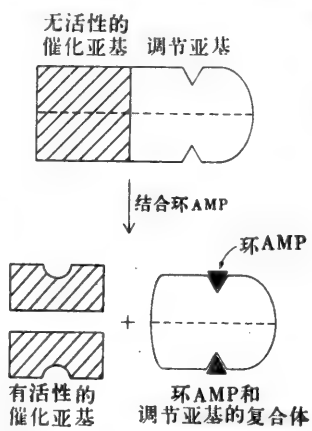


图35-6 环AMP解离蛋白质激酶的调节亚基和催化亚基的复合体，从而激活蛋白质激酶。

## 环AMP是一个古老的饥饿信号

前已述及，在细菌中环AMP有调节功能，即促进一定基因的转录（526页）。显然，作为一个调节分子，环AMP经历了一个长的进化史。在细菌中，环AMP是一个饥饿信号。它表示缺乏葡萄糖并导致合成能利用其他能源的酶。在一些哺乳动物的细胞中，例如肝脏和肌肉细胞，环AMP保留它作为一个古老的饥饿信号的作用。然而，它起作用是通过激活蛋白质激酶而不是通过增加某些基因的转录。另一个重要的差别是，在高等生物体内环AMP已经变成第二信使，在那里它参与细胞间的而不是细胞内的通讯。

在进化过程中为什么选择环AMP作为第二信使呢？似乎有三个重要的因素：

1. 环AMP是从ATP衍生来的，ATP是一种普遍存在的分子，这个反应是简单的，由随后的焦磷酸水解作用所驱动。
2. 虽然环AMP是从一个处于代谢转化作用中心的分子衍生而来，但是环AMP本身不处



在主要的代谢途径上。它仅用来作为一个代谢作用的综合者，不作为生物合成的前体或能量产生的中间体。因此，能够独立地控制它的浓度。其次，它是稳定的，除非被一个特异的磷酸二酯酶水解。

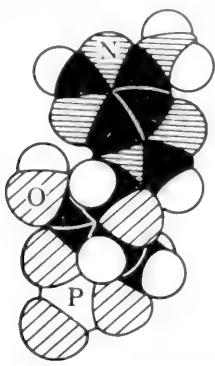


图35-7 环AMP的空间填充模型。

腺苷酸环化酶能合成许多环AMP分子。被环AMP激活的一个蛋白质激酶使许多蛋白质分子磷酸化，这样就提供了进一步的放大。糖原代谢调控中的酶的级联说明了为什么小的刺激能触发细胞内较大的变化。

### 霍乱毒素通过抑制G蛋白的GTP酶活性而激活腺苷酸环化酶

环AMP直接参予疾病过程，这一事实在霍乱病中已被完全确认了。这个可能致死的疾病是由霍乱弧菌引起的，这是一种由一根鞭毛推动前进的革兰氏阴性细菌。此病显著的临床特征是大量的腹泻。几小时内可能失去几升体液，如果体液得不到补充会导致休克和死亡。引起腹泻的是细菌的毒素，而不是细菌本身的直接作用。霍乱毒素(也叫霍乱肠菌素)能提高小肠粘膜腺苷酸环化酶的活力，于是就提高了这些细胞中环AMP的水平。环AMP异常高的水平刺激这些肠上皮细胞的主动离子运输，结果是Na<sup>+</sup>和水大量地流出进入肠道。

霍乱毒素是一个87kda的蛋白质，它含有由二硫键相连的A<sub>1</sub>和A<sub>2</sub>肽，及五个B肽。这种毒素与细胞表面的G<sub>M1</sub>神经节苷酯(353页)相互作用而进入细胞。毒素的B链识别这个富含糖的神经鞘脂类。进入细胞后，23kda的A<sub>1</sub>亚基共价地修饰控制腺苷酸环化酶活力的G蛋白。更准确地说，毒素的A<sub>1</sub>亚基催化ADP-核糖单位从NAD<sup>+</sup>到G蛋白中的一个精氨酸侧链的转移(图35-8)。这种ADP-核糖基化作用阻碍了G蛋白的GTP酶作用。换句话说，在修饰了的G蛋白中缺少了产生去活化作用的内部装置(见图35-5) 其结果是G蛋白被固定于GTP形式，因

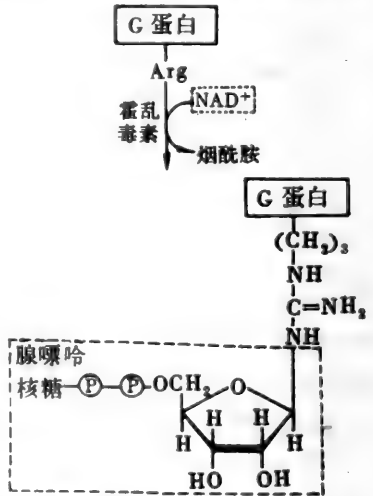
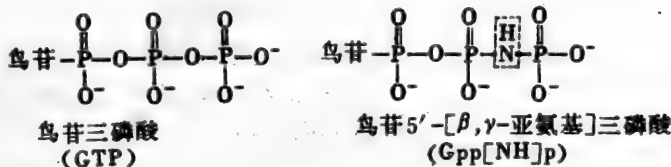


图35-8 霍乱毒素催化G蛋白的ADP-核糖基化作用 G蛋白是腺苷酸环化酶活力的一个调节物



此在没有激素时腺苷酸环化酶保持持续的活性。在体外通过加鸟苷酰亚氨二磷酸盐，一种不能水解的GTP类似物，到未加修饰的G蛋白中也能得到类似的作用。这种类似物像GTP一样，能激活G蛋白，但它不能转变为GDP。结果，通过鸟苷酰亚氨二磷酸盐与未修饰的G蛋白的结合，使得腺苷酸环化酶保持永久的活性，如同通过GTP与已经失去GTP酶活性的G蛋白结合一样。霍乱毒素的作用为G蛋白的GTP酶活性的重要性提供了进一步的证据。回想起来，白喉毒素也是通过ADP-核糖基化一个具有GTP酶活性的蛋白质而发挥它的有害作用的（556页）。



### 胰岛素促进合成过程和抑制分解过程

现在我们转到胰岛素。象前面章节讨论的一样（426页），胰岛素是在燃料代谢的整合作用中起着关键作用的一个多肽激素。在肌肉、肝脏和脂肪组织中胰岛素的一个统一的特征是：促进合成过程和抑制分解过程。准确地说，胰岛素提高合成糖原、脂肪酸和蛋白质的速度，也促进糖原酵解。这个激素的一个重要作用是：促进葡萄糖、一些其他的糖类和氨基酸进入肌肉和脂肪细胞。因此，胰岛素降低了血液中葡萄糖的水平（称为低血糖效应）。胰岛素抑制分解过程，诸如糖原和脂肪的分解。它也通过降低酶（如丙酮酸羧化酶和果糖1,6-二磷酸酶）的水平，以降低葡糖异生作用。胰岛素的许多作用与肾上腺素和胰高血糖素的作用相反。实质上，肾上腺素和胰高血糖素是葡萄糖不足的信号，而胰岛素是葡萄糖充裕的信号。

### 前胰岛素原和胰岛素原是活性激素的前体

桑格，F. (Frederick Sanger) 指出：牛胰岛素由二条链组成，一条21个残基的A链和一条30个残基的B链，它们通过两个二硫键共价地相联（图35-9）。相同的形式在许多不同种属，包括人的胰岛素分子中存在。这个二条链的蛋白质是怎样合成的呢？一个可能性是：A和B链分别被合成，由于非共价的相互作用使二条链以一种特异的方式相联系，然后形成正确的二硫配对。检验这个机制的方法是观测是否能在体外从还原的A和B链形成二硫键配对的正确的活性激素。安芬森曾用一个一条链的蛋白质——核糖核酸酶证明，在它被还原和伸展以后还能有效地重新卷曲成为一个活性的酶（25页），这个结果促进了上述检验的施行。但胰岛素实验的结果很不相同：恢复正确二硫键配对的分子少于4%。只有少量胰岛素能重新折叠的情况与糜蛋白酶的情况一样，糜蛋白酶是一个两个链间有二硫键相连的三条链的酶（119页）。相反，它的一条链的前体——糜蛋白酶原，重

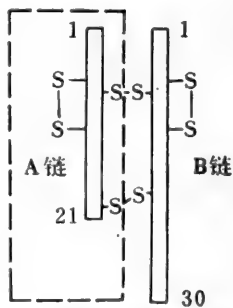


图35-9 胰岛素的链结构和二硫键配对。



就在内质网的管腔空间中由前胰岛素原形成胰岛素原。然后，胰岛素原被运送到高尔基体，

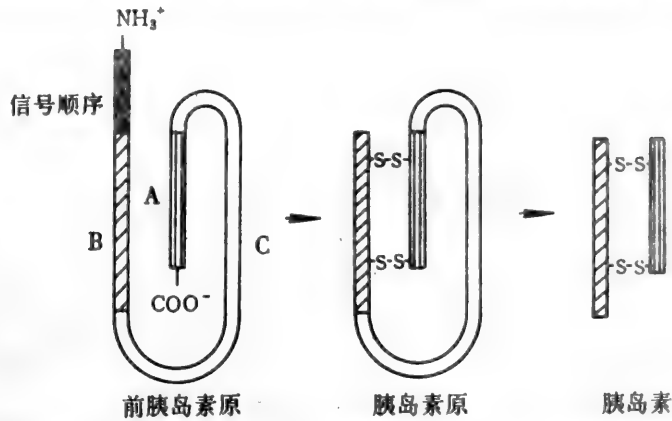
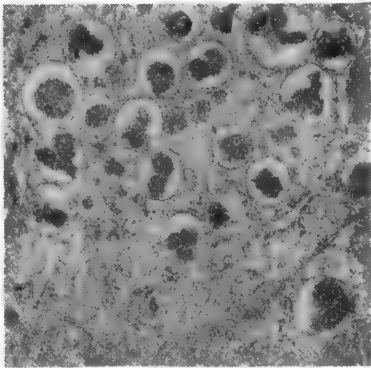


图35-12 前胰岛素原酶促转变成胰岛素原，然后再转变成胰岛素。

在那里开始水解其连接肽。在贮存颗粒中没有激素活性的胰岛素原继续形成胰岛素。不同种属的胰岛素原的连接肽有共同的结构特征。特别是，至今研究过的所有胰岛素原的连接肽在N端都含有Arg-Arg，在C端都含有Lys-Arg。一个类似胰蛋白酶的蛋白水解酶会从这些带正电荷的残基部位水解多肽链。当贮存颗粒的膜与细胞质膜融合时，胰岛素分子会从成熟颗粒中分泌出来。

图35-13 胰腺β细胞中含有胰岛素的贮存颗粒的电子显微镜照片。由于这些颗粒含有高浓度的激素以至在其中形成了小的胰岛素晶体。[蒙Dr.Arthur Like 特许。]



### 胰岛素的三维结构

在霍奇金，D. (Dorothy Crowfoot Hodgkin) 的实验室中完成的x射线晶体学分析揭示了分辨率为1.9Å的猪胰岛素的三维结构。这个成就是在霍奇金得到蛋白质晶体(胃蛋白酶)的第一张x射线衍射图样的将近三十六年之后完成的，那时她是伯纳尔，J. (John Bernal) 实验室的一个研究生。在这期间，霍奇金解出了象胆固醇，青霉素和维生素B<sub>12</sub>这样的在生物学上重要的分子结构。胰岛素有一个紧密的三维结构(图35-4)。仅B链的N端和C端从蛋白质的其余部分伸

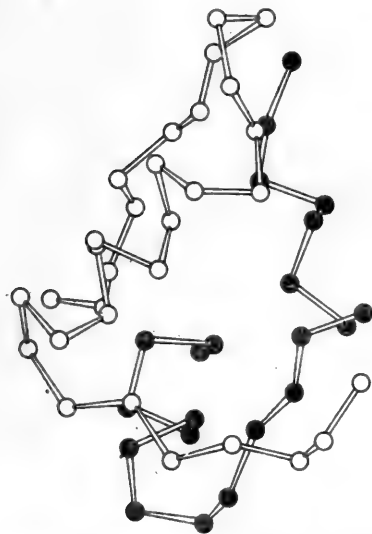


图35-14 胰岛素的α-碳原子骨架图。黑色表示A链，无色表示B链。

展开来。A链栖身于B链这些伸展的双臂之间。它有一个非极性的核心，由埋藏的A链和B链中的脂肪族侧链组成。除了A、B两条链间的二硫键外，几个盐键和链上基团之间的氢键也稳定了胰岛素。胰岛素原的构象属未知，然而光谱研究指出胰岛素原的三维结构与胰岛素非常类似。而且，胰岛素原能与胰岛素一起结晶出来。

### 胰岛素受体位于靶细胞的质膜中

正如因共价引入 $^{125}\text{I}$ 而具有高放射性的胰岛素所示出的那样，胰岛素非常紧密地与靶细胞质膜中特异的受体相结合。胰岛素-受体复合物的解离常数大约是 $10^{-10}\text{ mol/L}$ 。因为血液中的胰岛素水平低( $10^{-10}\text{ mol/L}$ 数量级)，所以这样紧密的结合是必要的。缔合作用的速度常数非常高(大约 $10^7\text{ mol}^{-1}\text{ Ls}^{-1}$ )，接近一个扩散控制反应的数值。一个脂肪细胞仅含 $10^4$ 个胰岛素受体，这相当于大约每平方微米质膜上有一个受体的密度。换句话说，每存在 $10^6$ 个磷脂分子仅存在一个胰岛素受体。

通过加入非离子去垢剂，例如Triton X-100，已从质膜中提取出胰岛素受体。溶解后的受体与完整质膜上的受体有相同的结合性质。通过亲和层析纯化溶解后的受体，这个分离过程

是利用受体的特异结合性质。胰岛素的受体紧密地结合在亲和柱上，后者由共价地连在琼脂糖上的胰岛素构成，而溶解后的膜制剂中的其他分子则并不结合。然后用酸性尿素溶液洗脱胰岛素受体，酸性尿素溶液使受体变性并从胰岛素-琼脂糖柱上解离下来。很幸运，通过除去尿素和提高溶液的pH，纯化的受体能够复性。卡特里凯塞斯，P. (Pedro Cuatrecasas) 用此方法成功地将其胰岛素受体纯化了250,000倍。这个受体中结合胰岛素的亚基是一个135kda的糖蛋白(图35-15)。

在肝匀浆膜蛋白中胰岛素受体只占约 $4 \times 10^{-3}\%$ 。这意味着为了得到1毫克纯受体蛋白，必须对二百只大鼠的肝匀浆中的500克蛋白质进行分级分离。为了氨基酸顺序和x射线晶体学的研究，以及为了重组实验，要得到足够的受体既是一个非常艰难的但又不是一个不可能完成的任务。

胰岛素的许多迅速的效应，例如激活氨基酸和葡萄糖穿过质膜，可能是通过它与质膜上的受体的相互作用触发的。胰岛素另一个早期的作用是磷酸化40S核糖体亚基中的一个单一蛋白质。这些激素效应不是通过改变环AMP的水平来介异的。对于胰岛素作用中的细胞内信使还无认识。

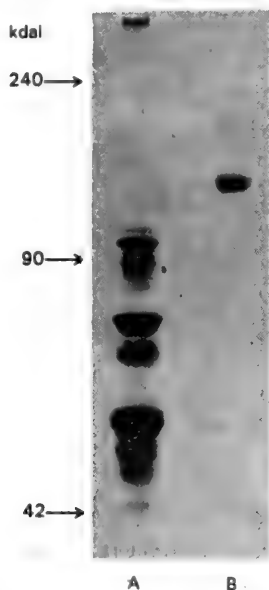
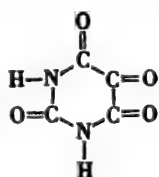


图35-15 凝胶电泳图(A)肝质膜的提取液，(B)纯化的胰岛素受体。电泳是在变性条件下进行的。[依据S. Jacobs, E. Hazum, Y. Schechter and P. Cuatrecasas, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76 (1979): 4919]

## 胰岛素的不足引起糖尿病

糖尿病是一个影响着几亿人的复杂疾病。糖尿病的特征是血和尿中的葡萄糖含量增高。当血糖量超过肾小管的重吸收能力，葡萄糖从尿水排泄。水随着葡萄糖排出，所以一个未治疗的糖尿病人在疾病的急性阶段感到饥饿及口渴。葡萄糖的丢失耗尽了糖贮存，于是就导致脂肪和蛋白质的分解。动用脂肪的结果是形成大量乙酰辅酶A。由于草酰乙酸盐不足，乙酰辅酶A不能进入柠檬酸循环，就会形成酮体（乙酰乙酸，丙酮和羟基丁酸）。我们记得，动物不能从乙酰辅酶A合成草酰乙酸盐。相反，草酰乙酸是从葡萄糖和一些氨基酸衍生出来的（422页）。酮体的排泄破坏了酸碱平衡，并引起进一步的脱水作用，这可能引起未经治疗的糖尿病人在疾病急性阶段时发生昏迷和死亡。

糖尿病的出现是由于胰岛素的不足。在大多数情况下，不知道根本的原因。动物的实验性糖尿病可用外科手术切除大部胰脏或通过化学方法破坏 $\beta$ 细胞而造成。给予阿脲能选择性地破坏这些产生胰岛素的细胞。给予抗胰岛素抗体也导致糖尿病。如给予胰岛素急性糖尿病即迅速消失。这个事实进一步证明：胰岛素的缺乏在糖尿病中起了一个重要作用。



阿脲  
(2,4,5,6-四氧嘧啶)

为什么一个糖尿病人缺乏胰岛素难以满足他的组织的需要呢？显然，目前看来许多种潜在的分子缺陷都能产生叫做糖尿病的临床表现。确定糖尿病病因的工作已经开始了：

1. **胰岛素原转变为胰岛素的缺陷** 位于A链（或B链）与胰岛素原连结肽的接合点上的残基的突变能妨碍它转变成胰岛素。这些病人的血浆中有高水平的胰岛素原，它是无活性的激素。

2. **结构不正常的胰岛素分子** 另一类突变是胰岛素分子关键区域中一个氨基酸残基的置换。例如，在接近B链C端以亮氨酸取代苯丙氨酸，所得胰岛素的活力只有正常激素活力的十分之一。有趣的是，从原始的八目鳗到人的进化上，胰岛素分子的这个区域是保持不变的。

3. **不正常的胰岛素受体** 一些病人分泌正常的胰岛素分子，但是它们并不按通常的方式与靶细胞结合。这些糖尿病人质膜上的胰岛素受体是有缺陷的。

4. **胰岛素受体的不健全偶联** 这些病人分泌的胰岛素分子是正常的。而且，他们的靶细胞含有通常数量的胰岛素受体。这些受体的结合特性也是正常的。这些糖尿病人的缺陷似乎在细胞内部。一个可能性是：这些病人的胰岛素-受体复合物并不与激素信号传递中的下一个组分相偶联。

多尿——因病中过多的排尿而得名。公元二世纪卡帕都森的内科医生阿雷托伊斯（Aretacus）写道：“将此疾病给以

糖尿病名称，因为它犹如通过虹吸管排水。”他深刻地描述糖尿病为“将肉体 and 四肢融解于尿。”

糖尿——来自拉丁文，意思是：以蜜糖甜化。指病人的尿中含有糖。

## 内啡肽是起类似鸦片剂作用的脑肽

鸦片制剂, 例如吗啡, 用来止痛已经有许多世纪了。1680年西德纳姆, T. (Thomas Sydenham) 写道: “在上帝赐予人类解除苦难的药物中, 没有一个能象鸦片这样万能和灵验。”为什么脊椎动物的脑含有从罂粟属植物种子汁中所得生物碱的受体? 神经药理学推测, 鸦片剂受体的作用是检测有关痛感的内源调节剂, 而不是对植物产物作出反应。根据这个观点, 吗啡是通过模拟脊椎动物体内正常存在的分子来发挥它的药理学作用的。1975年, 工作有了突破, 当时休斯, J. (John Hughes) 从猪脑中分离出了具有类似鸦片剂活力的二个肽。这些相关的五肽, 甲硫氨酸脑啡肽和亮氨酸脑啡肽, 在某些神经末梢中是很丰富的。它们很可能参与整合有关痛感的信息。

一年以后, 吉尔曼, R. (Roger Guillemin) 从脑下垂体中叶分离出了较长的肽, 叫做内啡肽。按克分子计算, 内啡肽止痛效力与吗啡差不多。将内啡肽注入实验动物的脑室, 它们即表现明显的反应。例如,  $\beta$ -内啡肽能引起全身出现几小时的镇痛作用。在此期间体温降低。而且, 动物处于淡漠状和采取一个伸展的姿势。内啡肽的这些作用在几小时内消失, 而动物又恢复正常活动。另一个惊人的发现是, 给予纳洛克斯松 (naloxone) (图35-16) 几秒钟后内啡肽的作用消失, 这是一个已知的吗啡的拮抗物。由内啡肽引起的有关行为的效应指出: 这些肽可能正常地参与调节感情上的反应。用来检验这个推测的许多实验方法已经得到发展。例如, 用放射免疫测定技术能专一地检定非常少量象内啡肽这样的肽。这个技术综合了放射性技术的灵敏性和免疫球蛋白结合的专一性。这里我们看到, 神经生物学和神经精神病学中正在开始一个新而有前途的领域。

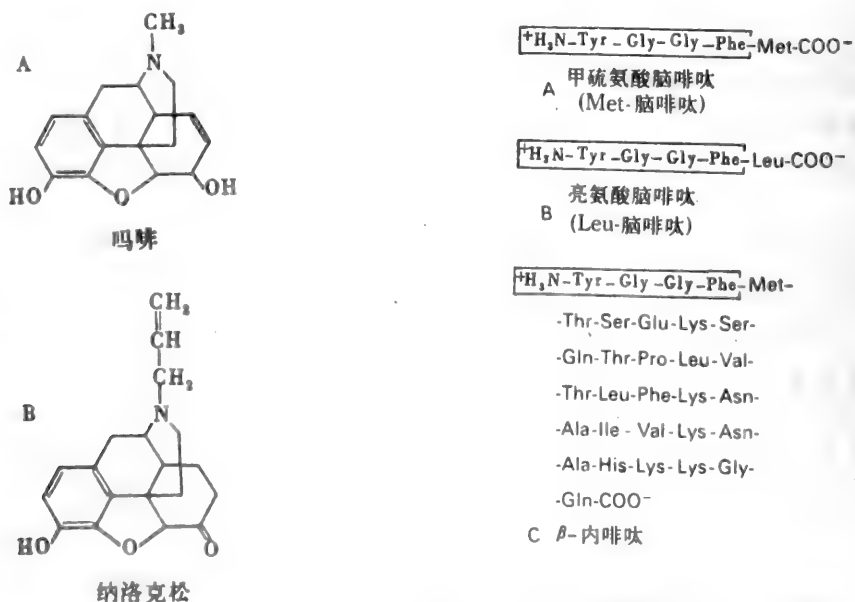


图35-16 (A) 吗啡 (一种鸦片剂) 和 (B) 纳洛克斯松 (吗啡的一种拮抗物) 的结构

图35-17 (A) 甲硫氨酸脑啡肽, (B) 亮氨酸脑啡肽和 (C)  $\beta$ -内啡肽的氨基酸顺序。框内表示共有的四肽的顺序。

## 鸦片皮质素原裂解产生几个肽激素

虽然 $\beta$ -内啡肽是一个新发现的激素,但是它的氨基酸顺序看上去是熟悉的。 $\beta$ -内啡肽与 $\beta$ -脂肪酸释放激素的C端区域有相同的顺序,后者是李卓豪(Choh Li)从脑下垂体分离出来的一种激素。事实上, $\beta$ -内啡肽是通过贮存颗粒中 $\beta$ -脂肪酸释放激素的水解断裂而在体内形成的。随后,发现了一个更大的蛋白质,它包括了促肾上腺皮质激素和 $\beta$ -脂肪酸释放激素两者的序列。因为它是鸦片激素和促肾上腺皮质激素的前体,所以这个29kda的激素前体叫做鸦片皮质素原(pro-opiocortin)(图35-18)。促肾上腺皮质激素(ACTH)促进肾上腺皮质的生长,并刺激它合成一系列固醇类激素。鸦片皮质素原也导致产生两个促黑素细胞激素(MSH)。其中一个叫 $\alpha$ -MSH,是促肾上腺皮质激素的片段,另一个叫 $\beta$ -MSH,来自 $\beta$ -脂肪酸释放激素(图35-18)。鸦片皮质素原N端的一半可能还是其他激素的来源。很显然,鸦片皮质素原是肽激素丰富的一个象征。这个激素前体似乎由四个同源的区域组成,它可能是通过连续的基因重复而进化出来的。

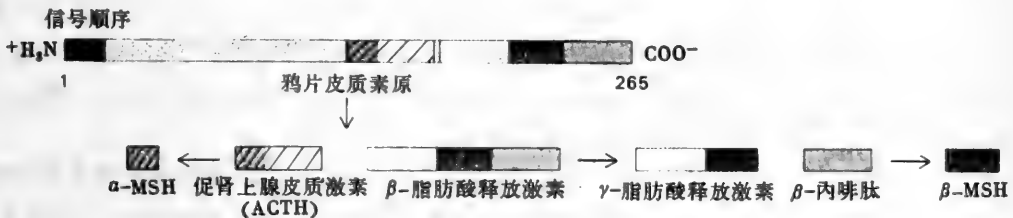


图35-18 鸦片皮质素原是几个肽激素生物合成的前体。

在鸦片皮质素原中,将来的活性激素之间的接合处含有碱性残基对(Lys-Arg, Arg-Arg或Lys-Lys)。有趣的是,在胰岛素原连接肽的边界上(见图35-11)和甲状旁腺激素前体中也有碱性残基对存在。碱性残基对一般可能标志着激素前体未来的裂解位点。

## 前列腺素是激素作用的调节剂

现在我们谈谈前列腺素,它是广泛影响生理过程的一细脂肪酸。这些化合物是在三十年代发现的,但最近才予以重视,主要是因为伯格斯特罗姆,S.(Sune Bergstrom)的开创性工作。前列腺素是一个二十个碳的脂肪酸,其中含有一个五碳环。其主要的类型称为PGA, PGB, PGE和PGF,后面跟着一个下标,下标表示环外碳-碳双键的数目。前列腺素似乎起着调节激素的作用,并不起激素本身那样的作用。它们经常改变自身被合成所在细胞的活力。这些作用的性质可因不同类型的细胞而不同。这与激素作用的均一性相反。

前列腺素PGE<sub>1</sub>对于脂肪组织中脂肪分解作用的机制已被详细研究。脂解作用被肾上腺素、胰高血糖素、促肾上腺皮质激素和促甲状腺激素等所激发。浓度为 $10^{-8}$  mol/L的PGE<sub>1</sub>强烈地抑制这些激素的脂解作用。一个有关的发现是,PGE<sub>1</sub>阻止了由这些激素引起的细胞内环AMP水平的提高。然而,PGE<sub>1</sub>不抑制由于加双丁酰环AMP而引起的脂解作用。因此,PGE<sub>1</sub>抑制脂肪细胞中的腺苷酸环化酶。在其他细胞中,前列腺素对环AMP水平可能有相反的作用。



前列腺素的许多主要作用的分子基础仍不知道。前列腺素的一些作用是：刺激炎症，调节特殊器官的血流量，控制离子穿过一些膜的运输和调整突触传导。临床上对前列腺素有很多兴趣。例如，前列腺素可能参与分娩过程。输注PG E<sub>2</sub>在几小时内可以引起分娩。也正在研究前列腺素作为避孕药的可能性。PG E<sub>2</sub>α减少黄体酮的分泌，黄体酮是受精卵在子宫中着床所需要的一个激素。

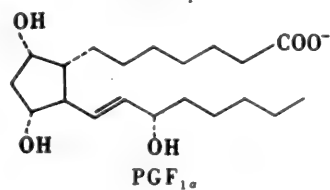
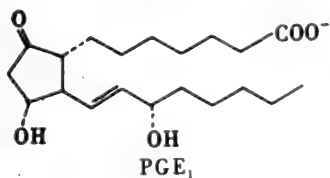
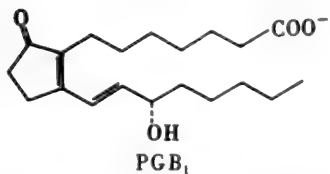
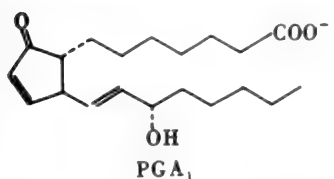


图35-19 一些前列腺素的结构

### 前列腺素是从不饱和脂肪酸合成的

前列腺素是从含有至少三个双键的C<sub>20</sub>脂肪酸在膜上合成的。在哺乳动物的饮食中需要这些多聚不饱和的脂肪酸（308页）。前列腺素的前体从膜磷脂上经磷脂酶作用释放出来。例如，PGE<sub>1</sub>的生物合成从Δ<sup>8</sup>, Δ<sup>11</sup>, Δ<sup>14</sup>二十碳三烯酸开始。通过前列腺素合成酶（也叫前列腺素环加氧酶）形成一个环戊烷环，并引入三个氧原子。如预料的一样，这三个氧原子都来自分子氧（图35-20）。催化这些反应的含有血红素的二加氧酶结合在光滑内质网上。

韦恩, J. (John Vane)发现，阿司匹灵通过使前列腺素合成酶失活来抑制前列腺素的生物合成。更准确地说，阿司匹灵（乙酰水杨酸）通过使此酶中一个亚基的末端氨基乙酰化而特异地抑制这个酶的加氧酶活力（图35-21）。前列腺素增强发炎作用，而阿司

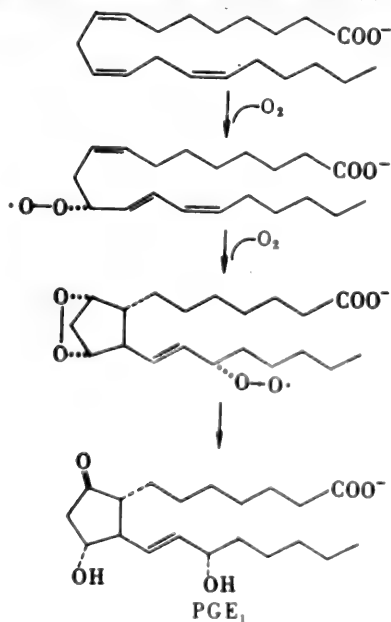


图35-20 从顺-Δ<sup>8</sup>, Δ<sup>11</sup>, Δ<sup>14</sup>-二十碳三烯酸开始合成PGE<sub>1</sub>

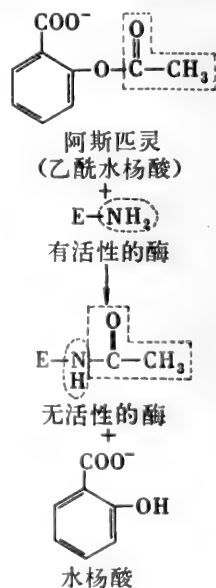


图35-21 阿司匹灵使前列腺素合成酶失活



匹灵减弱这个作用。阿司匹灵的这个药理学活力可能来自它对前列腺素生物合成的抑制。

## 类固醇激素激活特定的基因

象雌二醇、黄体酮和可的松这样的类固醇激素的主要效应是作用于基因表达，而不是作用于酶活力或运输过程。与肾上腺素相反，为了发挥其作用，这些激素必须进入它们的靶细胞。而且，它们的首先作用部位是在细胞核中，而不是在质膜上。这些类固醇充分发挥作用需要在几小时而不是在几分钟内完成，因为它们的生物作用依赖于新蛋白质的合成。放线菌素D抑制这些类固醇激素的作用。这意味着，为了发挥它们的作用需要合成新的信使RNA。

17 $\beta$ -雌二醇对子宫生长的促进作用的第一步是，这个激素与子宫细胞胞浆中一个专一性受体结合。结合是非常紧密的 ( $K \sim 10^{-9}$  mol/L)。然后，这个激素-受体复合物移动到细胞核内。雌二醇与受体的结合显著地增加了它对DNA的亲合力。而且，在结合雌二醇以后受体获得了一个第二亚基。这能从它的沉降系数从4S增加到5S反映出来。目前还不知道雌二醇受体在DNA上的结合部位是由碱基顺序还是由染色体蛋白所决定。激素-受体复合物同DNA

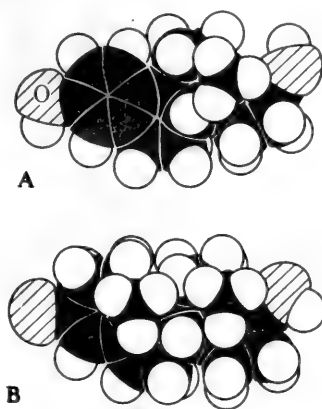
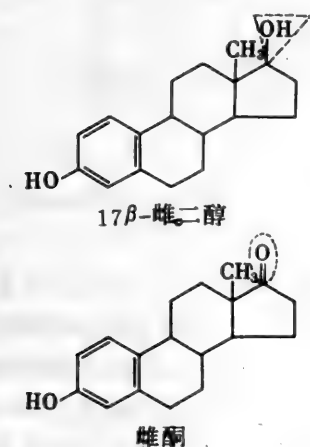


图35-22 (A) 17 $\beta$ -雌二醇，和(B) 雌酮的空间填充模型。

的相互作用是高度专一的。而且，受体通过与激素结合而活化的作用也是相当专一的。雌酮可与受体结合，但雌酮-受体复合物不与DNA相互作用，这与雌酮并不促进子宫生长的事实相一致。

雌二醇表现的各种相互作用可能为类固醇激素例示了一个一般的形式。例如，地塞米松，类固醇激素中的一个糖皮质激素，它也与组织培养的肝细胞瘤细胞浆中的专一受体结合。受体与激素结合后构象发生变化，然后移动到细胞核，在那里它结合到DNA的特定部位上。与这个受体结合的DNA部位的数量估计是 $1/10^6$ 碱基对。这个发现与观察到这个激素只影响少数几个基因的转录是一致的。类固醇激素对转录的高度选择性控制的机制是一个诱人的问题。

## 生长因子蛋白质（如NGF和EGF）促进靶细胞增殖

如何控制真核生物细胞的生长？最近分离出专门刺激靶细胞的生长因子蛋白质，这对回答这个需要解决的重要问题是一个有意义的开始。利维-蒙塔尔西尼，R. (Rita Levi-Mont-

talchini) 发现, 神经生长因子 (NGF) 在脊椎动物交感神经神经元和某些感觉神经元的发育中起着关键作用。NGF 促进这些细胞分裂和分化。从培养的神经节中生出轴突是鉴定这个生长因子的一个灵敏方法 (图35-23)。有生物活性的NGF 分子由二条相同的13kda1多肽链组成。这个二聚体(叫做 $\beta$ 亚基)以一个130kda1具有 $\alpha_2\gamma_2\beta$ 亚基结构的复合物形式, 贮存于颌下腺, 即它的合成部位中。 $\gamma$ 亚基是一个蛋白水解酶, 而 $\alpha$ 亚基抑制这个蛋白酶。NGF 的毒基是以一个含有 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的激素前体形式合成的, 然后 $\gamma$ 蛋白酶再将其裂解。NGF 的毒基顺序与胰岛素的相似。值得注意的是, 胰岛素除显著增加肌肉、肝和脂肪组织中的合成代谢过程外, 还对大部分细胞的生长起着促进作用。NGF 和胰岛素的基因可能有一个共同的祖先。

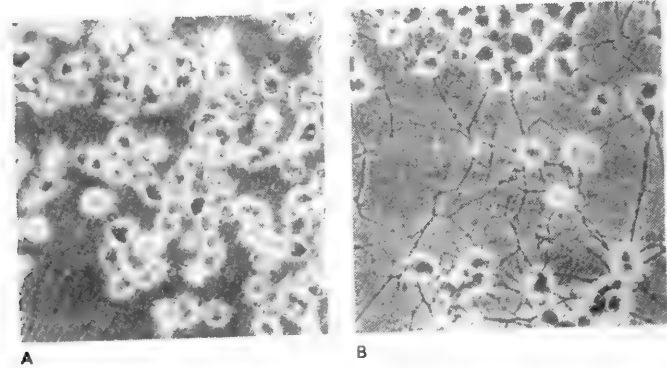


图35-23 神经生长因子 (NGF) 诱导培养的神经细胞长出轴突: (A) 未加NGF; (B) 加入NGF。  
[蒙Bruce Yankner, Christiana Richter-Landsberg, and Dr. Eric Shooter 特许。]

表皮生长因子 (EGF) 也已经被纯化和表征。这个 6 kda1 的多肽 (图35-24) 促进表皮和上皮细胞的生长。EGF与靶细胞质膜上的受体紧密结合。EGF-受体复合物的解离常数大约是 $10^{-10}$  mol/L。几分钟后, EGF-受体复合物群被内在化。内摄作用的部位是在含有包涵素的被膜凹陷区域 (561页)。然后, 含有EGF的小泡与溶酶体融合。NGF-受

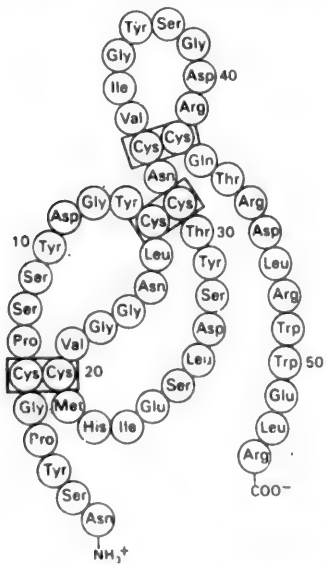


图35-24 表皮生长因子 (EGF) 的氨基酸顺序。[依据 C. R. Savage, Jr., J. H. Hash, and S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 248 (1973): 7669.]

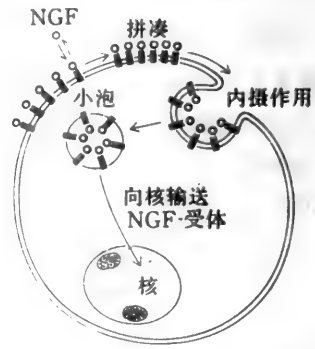


图35-25 NGF-受体复合物的内在化。[依据Dr. Eric Shooter惠赠的图。]

体复合物也同样是通过内摄作用进入细胞（图35-25）。查明这些复合物的内在化对于传送刺激信号到靶细胞核是否必须，将是很有意义的。

## 概 要

激素是一组多种多样的分子，它使多细胞生物各种细胞的活力整体化。环AMP作为靶细胞内的第二信使，在许多激素（例如肾上腺素和胰高血糖素）的作用中起着关键性的作用。这些激素与靶细胞质膜上的受体特异地结合，然后激活腺苷酸环化酶。这个结合在膜上的酶催化从ATP合成环AMP。鸟嘌呤核苷酸结合蛋白（G蛋白）将激素受体与腺苷酸环化酶偶联起来。腺苷酸环化酶的激活使细胞内环AMP的量增加。然后，环AMP激活蛋白质激酶，后者使一个或多个蛋白质磷酸化。例如，肌肉和肝脏中的糖原合成酶和磷酸化酶激酶的磷酸化作用，降低了糖原的合成，并增强了它的降解。这个级联反应放大了最初的激素刺激。环AMP作为一个调节分子，具有很长的进化史，最初它是一个饥饿信号。霍乱毒素催化G蛋白的ADP-核糖基化作用，这样导致了肠上皮细胞中腺苷酸环化酶持久的活化作用。因此，患霍乱病时大量的 $\text{Na}^+$ 和水流出进入肠道。

胰岛素促进合成代谢过程（例如，糖原、脂肪酸和蛋白质的合成）和抑制分解过程（例如，糖原和脂肪的分解）。胰岛素对膜运输有显著的作用。更准确地说，这个激素促进葡萄糖和氨基酸进入肌肉和脂肪细胞。前胰岛素原和胰岛素原是活性胰岛素生物合成的单链前体。前胰岛素原含有一个信号顺序，它在粗糙内质网管腔中被裂解下来。然后通过水解该激素中连接A链和B链的肽，胰岛素就从胰岛素原形成了。这个过程在高尔基器和贮存颗粒中发生。胰岛素被位于靶细胞质膜中特异的受体所识别。糖尿病是由于病人的胰岛素含量不能满足需要。这种疾病有许多潜在的起因，但它表现出的特征是血和尿中葡萄糖的水平提高。在一小部分的糖尿病人中发现了胰岛素原转变为胰岛素的缺陷，结构上不正常的胰岛素分子和细胞表面激素受体的缺陷。

内啡肽和脑啡肽是脑肽，它们的作用类似于鸦片剂（例如吗啡）。 $\beta$ -内啡肽从鸦片皮质素原衍生而来，这个激素前体也是其他活性肽，例如促肾上腺皮质激素（ACTH）， $\beta$ -脂肪酸释放激素和促黑素细胞激素（ $\alpha$ -MSH和 $\beta$ -MSH）的来源。在鸦片皮质素原中，正如胰岛素原中一样，预期的激素之间的接头处含有成对的碱性残基。一些小的蛋白质也起生长激素作用，例如神经生长因子和表皮生长因子。这些蛋白质刺激靶细胞分裂和分化。它们起作用的时间范围是以小时和日计，正如雌二醇，黄体酮和可的松这样的类固醇激素那样。类固醇主要用于基因表达。雌二醇进入它的靶细胞，并在胞液中与特异的受体结合。一个第二亚基再与这个复合物结合，然后它进入核并结合到DNA的特定部位。前列腺素是从 $\text{C}_{20}$ 多聚不饱和脂肪酸合成的，它起着调节激素的作用，而不起激素本身的作用。阿司匹灵通过共价修饰的酶来抑制前列腺素的合成，此酶催化氧的插入。

## 第36章 膜 运 输

生物膜是高选择性的通透性屏障。在细胞和它的环境之间分子和离子的流动是由特异的运输系统准确地调控着的。运输过程有几个重要的作用：

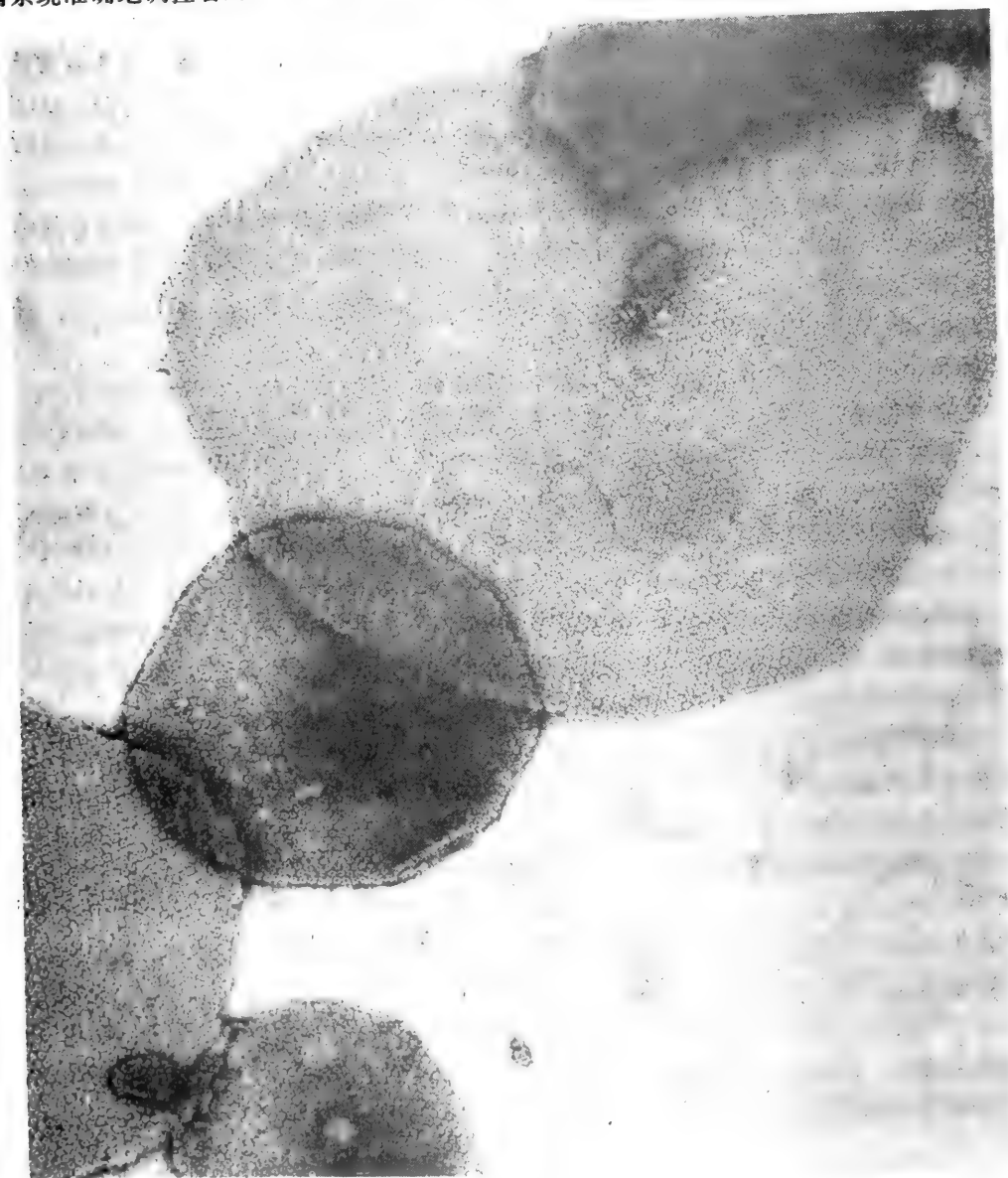


图36-1 负染的肝脏细胞间隙接头的电子显微照像。这些直径为 $15\text{ \AA}$ 的通道允许离子和小分子在相邻细胞内部之间流动。[引自E. L. Hertzberg and N. B. Gilula, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) : 2143. ]

1. 它们调节细胞体积并把细胞内的pH和离子组成维持在一个狭窄的范围内，以便为酶的活力提供一个有利的环境。
2. 它们从环境中吸取和集中代谢燃料和构造单元，并排出有毒的物质。
3. 它们产生为神经和肌肉的兴奋性所必须的离子梯度。

目前正在从分子水平阐明各种运输过程的机制。在这一章里考虑几个细菌和动物的运输系统。后者携带离子、糖和氨基酸穿过生物膜。同时也讨论微生物产生的运输抗菌素，因为它们结构的分析能阐明运输系统是如何区别象 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 这样的离子的。这一章的最后部分谈到连接邻近细胞内部的通道。这些导管(图36-1)在细胞间的通讯中起着重要作用。

### 被动运输和主动运输的区分

一个运输过程是被动还是主动的取决于所运输物质的自由能的改变。考虑一个不带电荷的溶质分子。从位置1（在那里它的浓度为 $c_1$ ）运输这个物质到位置2（在那里它的浓度为 $c_2$ ），自由能的变化是：

$$\Delta G = RT \log_e \frac{c_2}{c_1} = 2.303 RT \log_{10} \frac{c_2}{c_1}$$

对于一个带电的物质，还必须考虑跨膜电位。浓度项和电项的加和叫做电化学势。自由能的变化由下式给出：

$$\Delta G = RT \log_e \frac{c_2}{c_1} + Z F \Delta V$$

其中 $Z$ 是所运输物质的电荷， $\Delta V$ 是跨膜电位，以伏特表示。 $F$ 是法拉第( $23.062 \text{ kcal V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )。

当 $\Delta G$ 是正值时，一个运输过程肯定是主动的，而当 $\Delta G$ 是负值时，它可以是被动的。主动运输需要自由能的偶合输入，而被动运输能自发地产生。例如，考虑一个不带电荷的分子从 $c_1 = 10^{-3} \text{ mol/L}$ 到 $c_2 = 10^{-1} \text{ mol/L}$ 的运输。

$$\begin{aligned} \Delta G &= 2.3 RT \log_{10} \frac{10^{-1}}{10^{-3}} \\ &= 2.3 \times 1.98 \times 298 \times 2 \\ &= +2.7 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

在 $25^\circ\text{C}$  ( $298\text{K}$ ) 时， $\Delta G$ 是 $+2.7 \text{ kcal/mol}$ ，它指出这个运输过程是主动的，因此需要自由能的输入。这个运输过程，举例来说，由ATP水解驱动。此水解在标准状况下产生 $-7.3 \text{ kcal/mol}$ 能量。

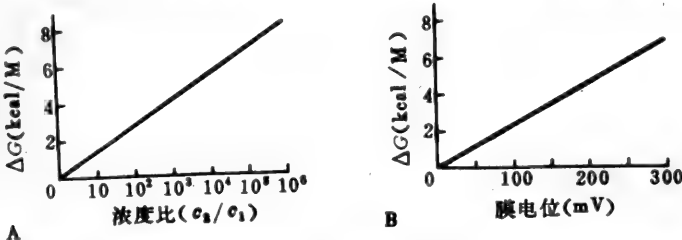
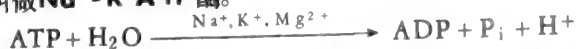


图36-2 运输(A)不带电荷的溶质从浓度为 $c_1$ 处到浓度为 $c_2$ 处和(B)带单电荷的物质穿过膜到与所运离子有相同电荷的一边，其间自由能的变化。注意：对于一个在 $25^\circ\text{C}$ 时的单负电荷离子来说，由膜电位 $59 \text{ mV}$ 造成的自由能变化等于由浓度比为10所造成的自由能的变化。

## 钠和钾离子主动运输系统的发现

大多数动物细胞相对于外部环境来说，有高浓度的 $K^+$ 和低浓度的 $Na^+$ 。这些离子梯度是由一个叫做 $Na^+-K^+$ 泵的特异运输系统产生的，因为这些离子的运动是相联系的。 $Na^+$ 和 $K^+$ 的主动运输在生理学上是非常重要的。实际上，静止动物所消耗的ATP有三分之一以上是被用来泵取这些离子的。在动物细胞里 $Na^+-K^+$ 梯度控制细胞体积，使得神经和肌肉细胞有电兴奋性，并推动糖和氨基酸的主动运输（677页）。

1957年，斯库，J. (Jens Skou) 发现了一种酶，此酶只有在 $Na^+$ 、 $K^+$ 和 $Mg^{2+}$ 同时存在时才水解ATP。这种酶叫做 $Na^+-K^+$ ATP酶。



斯库猜测： $Na^+-K^+$ ATP酶可能是 $Na^+-K^+$ 泵的组成部分，ATP的分解能提供主动运输 $Na^+$ 和 $K^+$ 所需要的能量。几方面的证据都表明， $Na^+-K^+$ ATP酶确实是 $Na^+-K^+$ 泵的一部分：

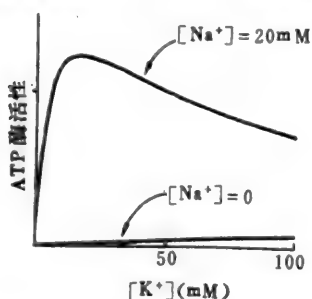


图36-3  $Na^+-K^+$ ATP酶是 $Na^+-K^+$ 泵的组成部分，它在除 $Mg^{2+}$ 之外还要 $Na^+$ 和 $K^+$ 共同存在时才水解ATP。(图中 $M = mol L^{-1}$ )

1.  $Na^+$ 和 $K^+$ 被主动运输的地方就有 $Na^+-K^+$ ATP酶存在。酶活力的水平定量地与离子运输的程度相关联。例如，神经细胞富含 $Na^+-K^+$ ATP酶和泵，而红细胞含这两者都很少。
2.  $Na^+-K^+$ ATP酶和泵都紧密地与质膜结合。
3.  $Na^+-K^+$ ATP酶和泵都在质膜里以相同的方式取向。
4.  $Na^+$ 和 $K^+$ 浓度的变化对ATP酶的活力以及与这些离子的运输速率有平行的效应。
5.  $Na^+-K^+$ ATP酶和泵都被强心类固醇专一地抑制。

对于这两个过程引起半-最大抑制的抑制剂浓度是相同的。

6. 在合适的离子条件下泵能反向，因而可从ADP和 $P_i$ 合成ATP。

## 酶和泵在膜中都是定向的

对红细胞空壳中 $Na^+-K^+$ 泵的研究揭示了这个ATP酶和泵的定向。在低渗的盐溶液中，红细胞肿胀并且在它的膜上出现破洞。血红蛋白扩散出来，留下一个灰白的细胞（因而呈一个空壳）。可将肿胀红细胞的内部与外界介质进行平衡。如将外部的介质制成等渗液，那么膜又可转为一个通透性屏障。因此，将空壳在一个适当的介质中重新密封就可控制空壳内的分子和离子的组成。对这种红细胞空壳的运输和酶的研究明确了 $Na^+-K^+$ 泵以下列方式定向（图36-4）：

1.  $Na^+$ 离子必须要在里面，而 $K^+$ 离子须在外面，以便激活ATP酶以及使它们穿过膜进行运输。
2. 只有当ATP位于细胞内时，它才是ATP酶和泵的

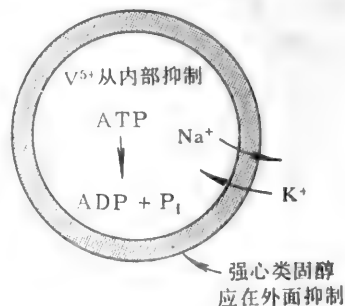


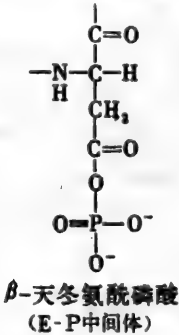
图36-4  $Na^+-K^+$ 泵在质膜中是定向的。

有效底物。

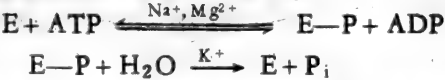
- 3. 只有当强心类固醇位于细胞外时，它们才抑制泵和ATP酶。
- 4. 只有当钒酸盐位于细胞内时，它才抑制泵和ATP酶。

ATP 短暂性地将钠-钾泵磷酸化

ATP如何推动Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>的主动运输呢?一个重要的线索是人们发现在Na<sup>+</sup>和Mg<sup>2+</sup>存在时，ATP能使Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATP酶磷酸化。磷酸化的部位是一个特定的天冬氨酸残基的侧链。如果有K<sup>+</sup>存在，这个磷酸化的中间体（E-P）就会被水解。



磷酸化反应不需要K<sup>+</sup>，而脱磷酸反应不需要Na<sup>+</sup>或Mg<sup>2+</sup>。



依赖Na<sup>+</sup>的磷酸化作用和依赖K<sup>+</sup>的脱磷酸作用不是唯一的关键性反应。泵也促使至少二个不同的构象（以E<sub>1</sub>和E<sub>2</sub>表示）之间的相互转换。至少有四个构象状态——E<sub>1</sub>，E<sub>1</sub>-P，E<sub>2</sub>-P和E<sub>2</sub>——参与Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>的运输及伴随的ATP的水解（图36-5）。每水解一个ATP，有三个Na<sup>+</sup>和二個K<sup>+</sup>被转运。因此，泵产生了一个跨质膜的电流。换句话说，Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATP酶泵是生电的。ATP酶的最快的转换数大约是100 s<sup>-1</sup>。

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATP酶能被毫微摩尔浓度的钒酸盐离子（V<sup>5+</sup>）抑制。这个五价离子将蛋白质固定于E<sub>2</sub>形式。对于磷酸基水解来说，钒酸盐是其过渡态类似物，因为它能采取类似磷酸盐那样的双锥体结构（图36-6）。

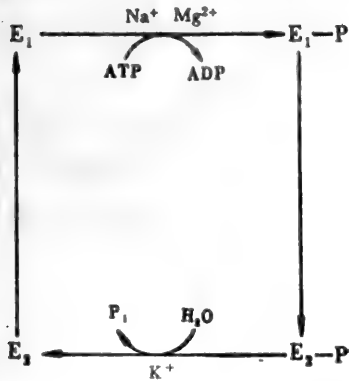


图36-5 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATP酶的构象循环。

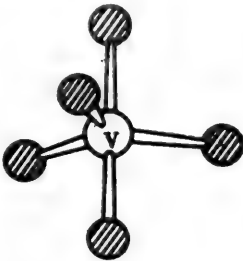


图36-6 钒酸盐离子（V<sup>5+</sup>）的结构。配体围绕这个离子的双锥排列与磷酸基水解过程中围绕磷原子的排列一样。



## 离子的运输和ATP的水解紧密偶联

这个泵的一个重要的特征是：只有运输 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 时才水解ATP。换句话说，系统是偶联的，以不致浪费贮存在ATP中的能量。紧密地偶联是介导能量转换的生物装置的一般特性。我们记得，电子一般不流过线粒体电子传递链，除非同时有ATP产生（248页）。ATP水解与肌肉收缩的必然偶联是这个原理的另一个例子。

$\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵能够反向，以合成ATP。当离子梯度非常陡时可以看到从ADP和 $\text{P}_i$ 净合成ATP。要做到这点可用比正常 $\text{Na}^+$ 浓度高得多和比正常 $\text{K}^+$ 浓度低得多的介质中温育红细胞。

### 钠-钾泵是寡聚跨膜蛋白质

$\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶是270 kdal的 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。大的 $\alpha$ 亚基（95 kdal）含有一个水解ATP的部位和一个结合强心类固醇抑制剂的部位。小的 $\beta$ 亚基（40 kdal）含有糖基。 $\alpha$ 亚基之间或一个

$\alpha$ 和一个 $\beta$ 亚基之间的交联容易形成，但 $\beta$ 亚基之间不能形成交联。这个现象指出， $\alpha$ 链相互接触，而 $\beta$ 链之间远远分开。如前指出，ATP水解部位是在膜的胞液一边，而类固醇抑制剂结合部位是在它的细胞外表面。因此，每个 $\alpha$ 亚基横越质膜（图36-7）。 $\beta$ 亚基的糖链和其他所有膜的糖蛋白一样处在质膜的细胞外面（171页）。

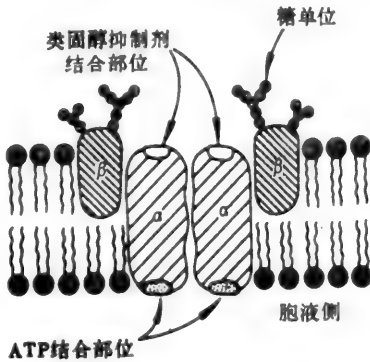


图36-7  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵的亚基结构及其取向的示意图。

有趣的是，这个酶复合物有一个结合类固醇抑制剂的部位，一个磷酸化作用部位和三个结合 $\text{Na}^+$ 的部位。 $\alpha_2\beta_2$ 四体怎么能有奇数的结合部位呢？一个可能性是：这些结合部位处在亚基的相交处。记得 $\alpha_2\beta_2$ 血红蛋白四聚体，在它的中心空穴中有一个结合二磷酸甘油酸的单一的结合部位（59页）。或者，酶的两个 $\alpha\beta$ 半份可能相互作用，因此与两个潜在部位中的一个结合就会妨碍与另一个的结合。事实上，许多寡聚蛋白质显示出半部位反应性。

### 钠-钾泵机制的一个模型

ATP酶的磷酸化作用和脱磷酸作用怎样导致 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的跨膜运输呢？因为关于这个泵的结构知道得还不够，所以尚不能提出一个详细的作用机制。然而，考虑一下贾德茨基，O.（Oleg Jardetzky）提出的一个泵的简单模型是有启发的。在这个模型中，蛋白质必须满足三个结构条件才能发挥一个泵的作用：

1. 它必须包含一个允许小分子或离子进入的足够大的空穴。
2. 它必须能采取两种构象，这样，一种构象形式的空穴向内开，而另一种形式的空穴向外开。
3. 两种构象对所运输物质的亲和力必须是不同的。



让我们把这个模型应用到 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的运输中（图36-8）。两个构象是前面描述过的 $\text{E}_1$ 和 $\text{E}_2$ 形式。我们假设：（1） $\text{E}_1$ 中的结合离子的空穴面向细胞内部，而在 $\text{E}_2$ 中空穴面向外边；（2） $\text{E}_1$ 对 $\text{Na}^+$ 有高亲和力，而 $\text{E}_2$ 对 $\text{K}^+$ 有高亲和力。这一模型也利用两个确认的事实：（1） $\text{Na}^+$ 触发磷酸化作用，而 $\text{K}^+$ 引起脱磷酸作用；（2）磷酸化作用稳定了 $\text{E}_2$ ，而脱磷酸作用使 $\text{E}_1$ 稳定。在图36-8中， $\text{E}_1$ 和 $\text{E}_2$ 有非常不同的形状。然而，必须强调，这些形式间的构象差别不需要很大。几个原子出现2 Å的移位可能就足以改变空穴对于 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的相对亲和力和改变它的取向。有充分的先例可以假设磷酸化作用很易引起这样大小的变化。让我们回忆一下，磷酸化作用对于糖原磷酸化酶和合成酶性质的影响和通过二磷酸甘油酸非共价结合到血红蛋白上而引起的对氧亲和力的改变。

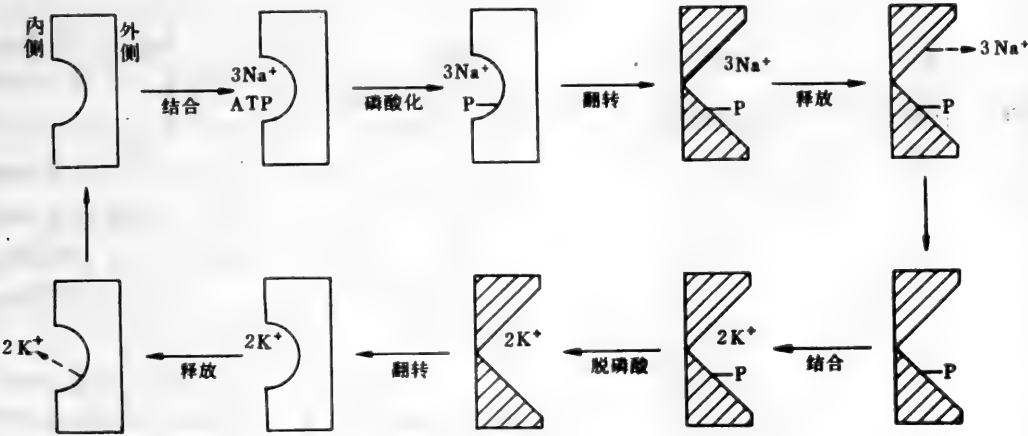


图36-8 假定的 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵机制示意图。上面一排反应描绘了三个 $\text{Na}^+$ 离子被逐出，而下面的反应表示二个 $\text{K}^+$ 离子的进入。在这里 $\text{E}_1$ （空白）和 $\text{E}_2$ （阴影）形式以非常不同的构象表示，而实际构象的差别可能是相当小的。

### 强心类固醇是钠-钾ATP酶和泵的专一抑制剂

从植物获得的一些类固醇是 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATP酶和泵的强效抑制剂。在抑制剂浓度是 $10^{-8} \text{ mol/L}$ 数量级时，两个过程的抑制作用皆达到半最大。毛地黄苷配基和乌巴因是这个类型抑制剂的成员，由于它们对心脏的强大作用，因而叫做强心类固醇（图36-9）。强心类固醇的活性取

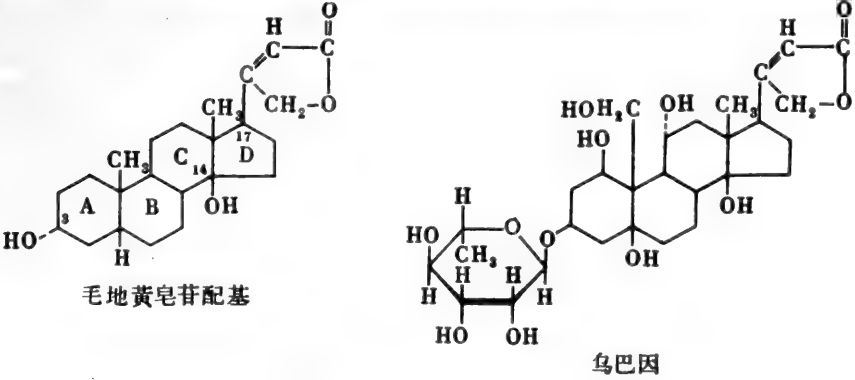
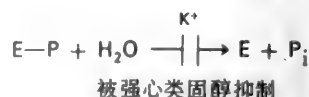


图36-9 强心类固醇如毛地黄苷配基和乌巴因抑制 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵。

决于在C-17上一个五元或六元不饱和 $\beta$ 构型的内酯环的存在。在C-14上的一个羟基和C与D环的顺式融合也是必须的。乌巴因和一些其他强心类固醇包含一个连在C-3上的糖残基，但在这些化合物抑制ATP酶中这种糖不起作用。

如前提及的，强心类固醇抑制 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶的脱磷酸反应。只有当强心类固醇位于膜的外表面时才发生抑制作用。因此，这些类固醇对脱磷酸的抑制作用和 $\text{K}^+$ 对脱磷酸的激活作用有相同的空间不对称性。



强心类固醇，如毛地黄，具有很大的临床意义。毛地黄增强心肌的收缩力，这使它成为治疗充血性心力衰竭的一个选用药物。毛地黄对 $\text{Na}^+-\text{K}^+$

泵的抑制导致细胞内 $\text{Na}^+$ 水平的增高。随后细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平的提高增强了心肌的可收缩性。有趣的是，早在发现 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶以前人们就在有效地使用毛地黄。1785年，内科医生和植物学家威瑟林，W. (William Withering) 发表了“关于毛地黄及其一些药物用途”的报导。他描述了他是如何开始认识到使用毛地黄来治疗充血性心力衰竭的：

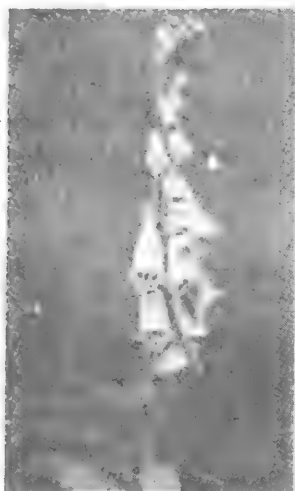


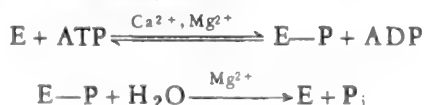
图36-10 一种毛地黄植物。[引自A. Krochmal and C. Krochmal, *A Guide to the Medicinal Plants of the United States* (Quadrangle Books, 1973), P. 243. 蒙 Dr. James Hardin 特许。]

1775年，关于一个家庭接受治疗水肿病的问题，曾有人征求我的意见。我听说Shropshire有一位老太太长久以来保持着这个秘密，在一些正式的医生失败之后，她有时能治愈。……这个药由二十种或更多的不同的草药组成，但一个熟悉这些物质的人不难看出：有效的草药可能正是毛地黄。……它对心脏运动的影响程度之大在任何其他的药中都没有观察到。这个影响可能被用以增进健康。

## 钙由不同的ATP酶运输

钙离子在调节肌肉收缩（642页）和许多其他生理过程中起着重要的作用。骨骼肌含有结合在膜上的小管和泡的错综网络。这个称作肌质网的膜系统控制着肌肉的收缩性肌纤维周围的 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度。静止时， $\text{Ca}^{2+}$ 被泵入肌质网，致使肌纤维周围的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度非常低。由一个神经冲动引起的肌质网膜的兴奋导致大量 $\text{Ca}^{2+}$ 的突然释放，于是触发了肌肉收缩。换句话说， $\text{Ca}^{2+}$ 是神经冲动和肌肉收缩之间的媒介物。

肌质网对 $\text{Ca}^{2+}$ 的运输由ATP的水解推动。在肌质网里有一个由 $\text{Ca}^{2+}$ 激活的ATP酶。这个 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶是 $\text{Ca}^{2+}$ 泵的一个不可少的组成部分，正象 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶是 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵的一部分一样。 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶也由ATP暂时地磷酸化。



在磷酸化和脱磷酸作用推动的构象变化的循环中，每一个ATP的水解运输二个 $\text{Ca}^{2+}$ 。这个ATP酶对 $\text{Ca}^{2+}$ 的非常高的亲和力 ( $K \sim 10^{-7} \text{ mol/L}$ )，使它能有效地将 $\text{Ca}^{2+}$ 从胞液（在那里 $[\text{Ca}^{2+}] < 10^{-5} \text{ mol/L}$ ）运输进入肌质网（在那里 $[\text{Ca}^{2+}] \sim 10^{-2} \text{ mol/L}$ ）。

肌质网膜中 $\text{Ca}^{2+}$ 泵 的密度很高，大约是 $20,000/\mu\text{m}^2$ 。事实上，大于80%的膜本体蛋白都是 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶，后者占了三分之一的表面积。 $\text{Ca}^{2+}$ 泵的大亚基（100kdal）横跨过膜并含有磷酸化部位。象在 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵中一样，这个部位是一个特定的天冬氨酸侧链。另一个相似性是：一个55kdal的糖蛋白与太亚基相缔合。

由纯化的 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶和磷脂可重建有功能的 $\text{Ca}^{2+}$ 泵。用胆酸盐（一种去垢剂）将膜增溶后，可从肌质网膜分离 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶。将这个溶解的酶加到大豆中获得的磷脂中。通过透析除去去垢剂后便形成膜小泡。当供给ATP和 $\text{Mg}^{2+}$ 时，这些重建的小泡能快速泵抽 $\text{Ca}^{2+}$ 。

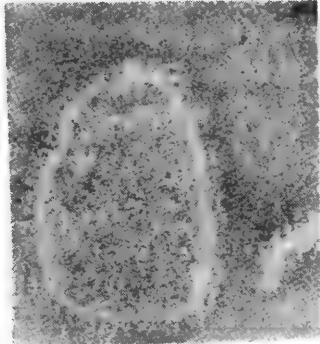


图36-11 从纯化的 $\text{Ca}^{2+}$ ATP酶形成的膜小泡。膜表面的球状颗粒是ATP酶分子的一部分，酶分子延伸过膜。[引自P. S. Stewart and D. H. MacLennan, *J. Biol. Chem.*, 249 (1974): 987.]

### $\text{Na}^+$ 的流动推动了糖和氨基酸主动运输进入动物细胞

许多运输过程不是直接由ATP水解所推动，而是与一种离子沿它的电化学梯度向下的流动相偶联。例如，由于 $\text{Na}^+$ 的同时进入，葡萄糖被泵入许多动物的细胞。事实上，钠离子和葡萄糖是与一个专属的运输蛋白结合并一起进入。两种物质协调的运动叫作协同运输。同向转运将两种物质向同一方向运送，而反向转运将它们向相反的方向运送。依靠同向转运与葡萄糖分子一起进入细胞的钠离子由 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶泵出细胞(图36-12)。葡萄糖的运输速度和程度取决于 $\text{Na}^+$ 的跨膜浓度梯度。

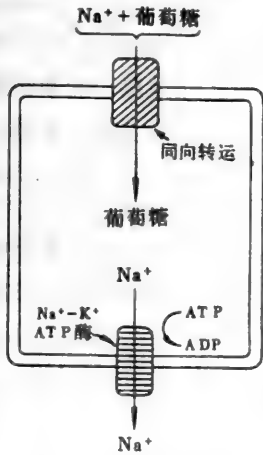


图36-12  $\text{Na}^+$ 的梯度推动葡萄糖的主动运输。这个同向转运系统存在于肠细胞和肾细胞的质膜中。

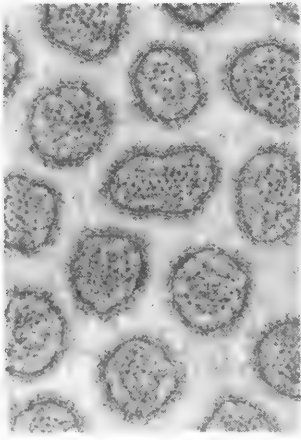


图36-13 肠微绒毛横切片的电子显微照像，微绒毛大大增加了运输表面积。[蒙Dr. George Palade 特许。]

动物细胞广泛使用由 $\text{Na}^+$ 推动的同向转运以积累氨基酸。一些细胞，如肠微绒毛的刷状缘（图36-13），也富有同向转运以主动运输糖。为 $\text{Cl}^-$ 的上向转移，小肠还有一个专一化的 $\text{Na}^+$ 推动的同向转运。钠离子在从各种细胞中推出钙离子的反向转运中也是推动力。动物细胞中的大多数同向转运和反向转运由 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶所产生的 $\text{Na}^+$ 梯度来推动。

## 质子的流动推动许多细菌的运输过程

同向转运和反向转运是古老的分子机器。许多细菌的运输系统由质子的跨质膜流动来推动。在细菌中了解得最多的同向转运系统是大肠杆菌中运输乳糖的系统（图36-14）。这个在哺乳动物肠道下部内的常客已经逐渐形成了集中乳糖的高效机构。这个二糖的泵是一条30kdal的单一多肽链，称作乳糖透酶（或M蛋白），它由肯尼迪，E. (Eugene Kennedy) 分离获得。这个膜本体蛋白由*lac*操纵子的*y*基因编码（523页）。它大约构成4%诱导细胞膜蛋白。

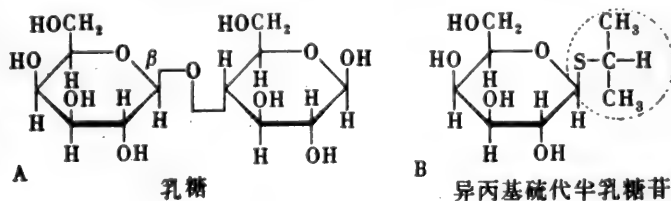


图36-14 乳糖透酶运输 $\beta$ -半乳糖苷，如(A)乳糖，(B)异丙基硫代半乳糖苷。由于硫代半乳糖苷由乳糖透酶运输，但又不被 $\beta$ -半乳糖苷酶所水解，所以它在这个系统的研究中是很有用的。

对*y*基因突变株的分析有助于理解这个泵的机制。对认识它的作用也通过研究细菌膜所

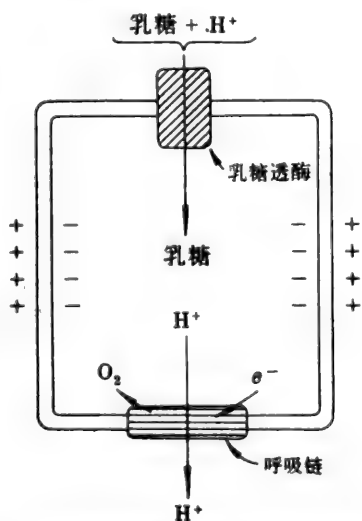


图36-15 质子梯度推动一些糖和氨基酸主动运输入细菌。电子流经呼吸链产生这个质子梯度。

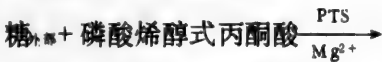
产生的小泡。这些小泡比整个细菌要简单得多，所以对于研究运输是有吸引力的。它们含有氧化磷酸化的机构以及其他膜结合蛋白，但是缺少完整细胞的胞质成分。这些膜泡不能单独地积累乳糖，但借加入底物能刺激它们去积累，底物能把它们的高电位电子转移到呼吸链。或者，由于外部呈酸性而迫使产生的一个pH梯度，也能引起乳糖的积累。由 $K^+$ 梯度造成的膜电位也能泵移乳糖。这些实验指出，主动运输乳糖的推动力是跨质膜的质子移动力。乳糖分子的运输与质子进入细胞的运动相偶联。在生理条件下，这个主动运输所需要的质子梯度是通过电子从高电位供体（例如NADH）流经呼吸链所产生。这个乳糖-质子同向转运例证了所谓“由质子梯度造成的能量转导作用”，这是由米切尔，P. (Peter Mitchell) 发展起来的统一的概念（251页）。

## 一些糖的主动运输与它们的磷酸化作用相偶联

同向转运不是主动运输糖的泵的唯一类型。有些细菌积累糖是将它们偶联入磷酸化作用。

例如，葡萄糖被运输入许多细菌的过程中，它被转变成为葡糖6-磷酸。这个运输类型称作基团移位，其与众不同的特征是：在运输中溶质被改变。细胞膜对于糖的磷酸盐是不可通透的，所以它们在细菌内部积累。

理解得最清楚的基团移位过程是罗斯曼，S. (Saul Roseman) 发现的，由磷酸转移酶系统 (PTS) 进行的过程。这个系统的一个不寻常特征是：磷酸基的供体是磷酸烯醇式丙酮酸，而不是ATP或另一个核苷三磷酸。由磷酸转移酶系统实现的总反应是



糖-磷酸<sub>内部</sub> + 丙酮酸

四个蛋白质参与了这个基团移位：HPr，酶 I，酶 II 和酶 III。酶 II 是一个膜本体蛋白，它形成跨膜的通道并催化糖的磷酸化作用。磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸基不是直接转移到糖上去，而是先从磷酸烯醇式丙酮酸转移到酶 I，然后到 HPr 的一个特定的组氨酸残基上；HPr 是一个热稳定的小蛋白质 (图36-16)。这个磷酸组氨酸中间体有高的基团转移势能，介于磷

表36-1 大肠杆菌中由磷酸转移酶系统运输的糖

葡萄糖
果糖
甘露糖
N-乙酰葡萄糖胺
甘露醇
山梨醇
半乳糖醇
乳糖

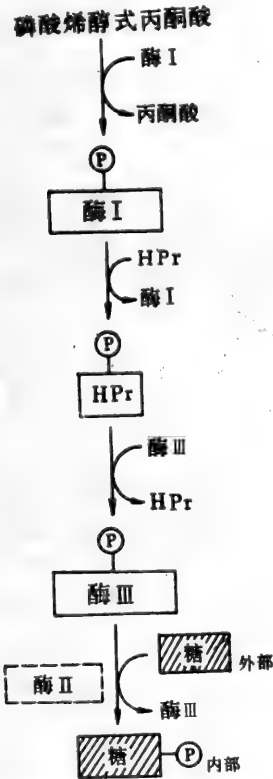
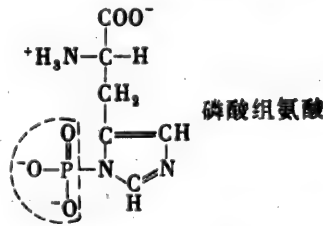


图36-16 被磷酸转移酶系统所移位的糖中磷酸基从磷酸烯醇式丙酮酸向糖的流动。

酸组氨酸中间体的和ATP的势能之间。然后，磷酸化的HPr将它的磷酸基转移到酶 III，酶 III 是与酶 II (即实际通道) 相互作用的外周膜蛋白。最后的步骤是磷酸基从酶 III 转移到正被移位的糖上 (图36-17)。这四个纯化的蛋白质已经重组了有功能的酶复合物。



酸烯醇式丙酮酸的和ATP的势能之间。然后，磷酸化的HPr将它的磷酸基转移到酶 III，酶 III 是与酶 II (即实际通道) 相互作用的外周膜蛋白。最后的步骤是磷酸基从酶 III 转移到正被移位的糖上 (图36-17)。这四个纯化的蛋白质已经重组了有功能的酶复合物。

磷酸转移酶系统中的一些蛋白质是一般的，而其他的一些是特异的。HPr和酶 I 是胞液中可溶性蛋白质，它们参与运输经这系统移位的全部的糖。相反，酶 II 和酶 III 是专一于特定的糖的。例如，运输葡萄糖、乳糖和果糖需要不同的酶 II 和酶 III。遗传学的研究进一步证实了这些结论。存在HPr或酶 I 缺陷的突变体不能运输多种不同的糖，而存在酶 II 或酶 III 缺陷的突变体则不能运输某一特定的糖。

酶 III 不参与己糖醇 (例如半乳糖醇) 的移位作用；磷酸基是直接从HPr转移到糖的。

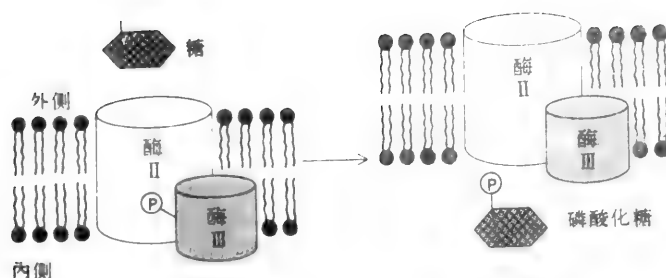


图36-17 由磷酸转移酶系统执行的基团移位作用的假拟机制。

为什么与诸如乳糖透酶等运载体相比磷酸转移酶系统是如此复杂？一个可能的原因是，

磷酸转移酶系统除了介导糖的运输外还有调节作用。由磷酸转移酶系统吸收的任何的糖当达到充裕时，就强烈地抑制由其他系统引入的糖的主动运输。这个作用似乎是通过环AMP水平的变化来传递。确切地说，即被磷酸转移酶系统移位的糖的浓度升高时，导致环AMP的产生减少（图36-18）。然后几个诱导操纵子的转录即停止。我们记得，诱导性的分解代谢的操纵子（例如*lac*和*gal*操纵子）的表达在环AMP和CAP蛋白的复合物与操纵子的启动子位点结合时有显著的增强（526页）。因此，磷酸转移酶系统调节碳源的获得。

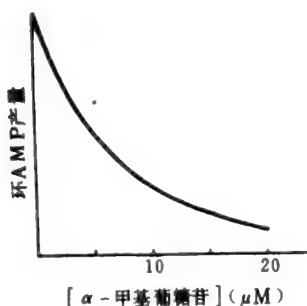


图36-18 由磷酸转移酶系统运输的一个糖—— $\alpha$ -甲基葡萄糖苷，抑制环AMP的产生。  
(图中  $M = \text{mol/L}$ )

### 运输抗菌素提高膜的离子通透性

有些微生物能合成使膜对某些离子能通透的化合物。这些称为运输抗菌素的小分子除了用以研究离子结合机制外，还是有用的实验工具。例如：缬氨霉素使线粒体对 $K^+$ 能通透，从而干扰线粒体中的氧化磷酸化作用。结果是，线粒体用电子传递产生的能量来积累 $K^+$ ，而不是去产生ATP。缬氨霉素是由四种类型的残基（A，B，C和D）重复三次而组成的重复性环状分子（图36-19）。这四类残基交替地通过酯键及肽键连接起来。

短杆菌肽A是另一个被广泛研究的运输抗菌素（图36-20）。短杆菌肽A是含有15个氨基酸残基的开链多肽。其结构的显著特征是L-和D-型氨基酸交替存在。同时，这个多肽的N端和C端是经修饰的。短杆菌肽A和缬氨霉素以全然不同的方式运输离子，下面将要对此进行讨论。

在明确鉴定的模型系统，例如脂类双层小泡（164页）和平面双层膜（165页）的模型中，这些抗菌素的离子运输是易于研究的。在放射性离子（例如 $^{42}K^+$ ）存在下超声处理膜，再通过凝胶过滤除去未捕集的 $^{42}K^+$ ，就可制备含有放射性离子的小泡。然后，在有和没有运输抗菌素存在的情况下测定这个放射性离子的流出速率。另一个获得双层膜的离子通透性信息的方法是测定电性质，象膜电阻和膜电位。例如，当跨膜梯度为 $0.02 \text{ mol/L } KCl$  时， $10^{-7} \text{ mol/L}$

缬氨霉素或 $10^{-9}$  mol/L短杆菌肽的存在使双层膜对 $K^{+}$ 的阻力降低10,000倍以上。

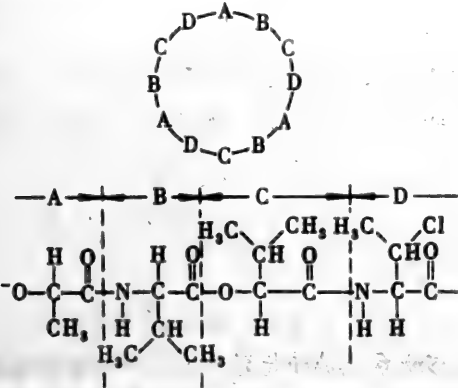


图36-19 缬氨霉素是由L-乳酸 (A), L-缬氨酸 (B), D-羟基异戊酸 (C) 和D-缬氨酸 (D) 残基组成的重复性环状分子。

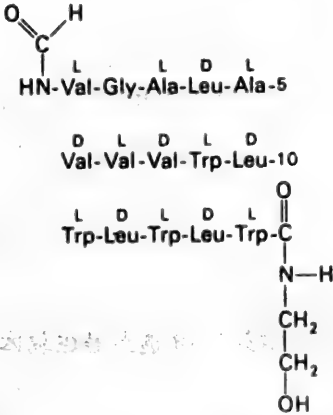


图36-20 短杆菌肽 A 的结构。

### 运输抗菌素是载体或通道形成体

运输抗菌素通过两种相反的方式使膜能通透离子 (图36-21)。在这些抗菌素中有的 (例如短杆菌肽 A) 形成跨膜通道。离子从膜的一个表面进入这个通道, 并经过它扩散到膜的另一边。运输离子时, 通道形成体本身不需移动。另一类抗菌素 (例如缬氨霉素) 的功能则是载运离子通过膜的碳氢化合物区。这些运输抗菌素的扩散对其功能来说是必要的。

用实验来区别载体和通道形成体, 可采取下面的方法。对含有运输抗菌素的合成的脂类双层膜的离子传导性, 可通过脂类的转变温度作为温度的函数被测量。在这样的热转变中, 膜的碳氢化合物内部从实质上的冻结状态变到高流动状态。若是通道形成体, 则在介导离子穿过膜的运输中不需要扩散。因此, 碳氢化合物核心的冻结对其运输离子的功能应该没有什么影响。相反, 冻结应该显著地降低载体的效率, 因为载体的功能依赖于扩散通过碳氢化合物

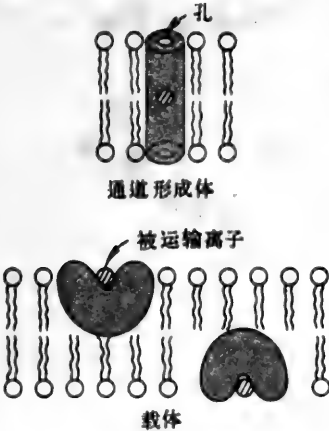


图36-21 通道形成运输抗菌素与载体运输抗菌素对比的示意图。所有已知的蛋白质运输物都是通道形成类型的。

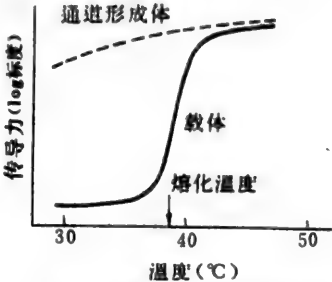


图36-22 脂类双层膜含有通道形成和载体运输抗菌素, 比较两者的传导力对温度的相依性。



区。对缬氨霉素和短杆菌肽A的实验数据能区分这些机制(图36-22)。当膜熔化时,含有缬氨霉素的双层膜的传导力增加一千多倍。相反,膜的熔化对短杆菌肽A的运输活力相对不起影响。

重要的是,迄今研究过的所有的天然存在的运输系统都是通道。象在前面的章节中讨论的那样(173页),膜本体蛋白的分子翻转运动非常缓慢或根本没有。因此,它们不能作为扩散性载体。

### 在环状炸饼形载体抗菌素中心腔中结合离子

x射线晶体学和光谱法的研究指出,运送离子的运输抗菌素有一些共同的结构特征。迄今研究过的载体有一个象环状炸饼样的形状。一个单一金属离子与几个围绕中心腔的氧原子配位。典型的结合金属离子的氧原子的数量是六或八。载体的外周由碳氢化合物基团组成(图36-23)。

碳氢化合物外周

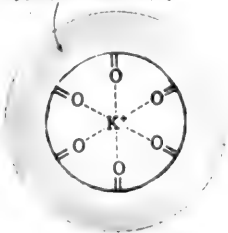


图36-23 载体运输抗菌素的氧原子与K<sup>+</sup>整合的示意图。

碳氢化合物外周的中心氧原子的功能是明显的。在水的介质中,一个金属离子(例如K<sup>+</sup>)通过水分子中的氧原子与几个水分子结合。载体与水竞争结合离子,它将离子整合到几个适当排列的中心腔中的氧原子上去。外周的碳氢化合物使离子-载体络合物溶于膜的脂类内部。实质上,这些抗菌素是通过使离子溶于脂类来催化离子的跨膜运输。

图36-24是缬氨霉素和它的K<sup>+</sup>络合物的结构。K<sup>+</sup>离子与六个氧原子配位,氧原子围绕分子的中心呈八面体排列。这些氧原子来自抗菌素中六个缬氨酸残基的羰基。甲基和异丙基侧链构成缬氨霉素的碳氢化合物外周。

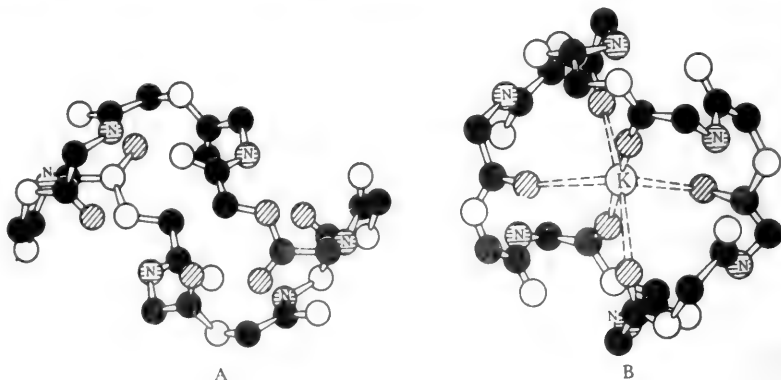


图36-24 (A) 缬氨霉素和(B) 缬氨霉素与K<sup>+</sup>的络合物模型。抗菌素与K<sup>+</sup>结合后构象发生变化。[根据Dr. William Duax提供的缬氨霉素和Dr. Larry Steinrauf提供的缬氨霉素K<sup>+</sup>络合物的原子配位绘制。]

无活菌素是另一个运送离子的抗菌素,它与K<sup>+</sup>的络合物的结构也是有趣的(图36-25)。离子与分子中心的八个氧原子结合。其中四个氧原子来自羧基,其余的四个则是醚氧。



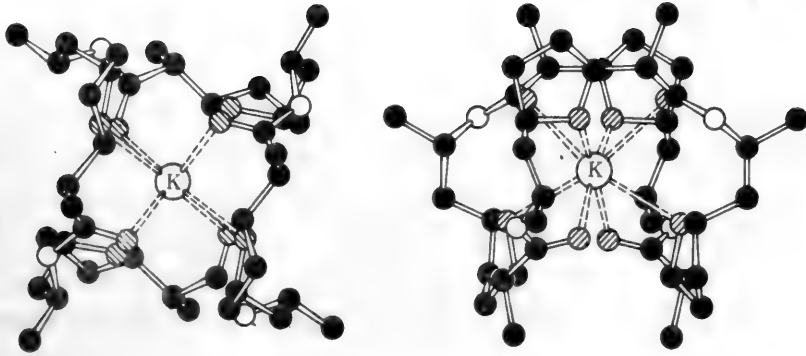


图36-25 无活菌素与 $K^+$ 的络合物模型的两个面视图。

### 缬氨霉素结合 $K^+$ 比结合 $Na^+$ 强一千倍

离子运输物如何区别象 $Na^+$ 和 $K^+$ 这样相关的离子呢？缬氨霉素结合 $K^+$ 比结合 $Na^+$ 大约强一千倍。这个鉴别能力甚至比 $Na^+-K^+$  ATP酶所达到的还高，所以研究它的原理是有启发的。光谱法的研究指出，缬氨霉素的 $Na^+$ 络合物与 $K^+$ 络合物的结构非常相似。甚至，这些络合物的中心阳离子和配位氧原子间的键长也是相似的。那么为什么缬氨霉素结合 $K^+$ 比结合 $Na^+$ 更紧密呢？这种选择性的理由是：水对于 $K^+$ 比对 $Na^+$ 有较低的吸引力。 $Na^+$ 的溶剂化作用的自由能是 $17\text{kcal/mol}$ ，它比 $K^+$ 的溶剂化更有利（表36-2）。于是，由于缬氨霉素需要更高代价才能拉 $Na^+$ 离开水，所以缬氨霉素结合 $K^+$ 更牢固。

表36-2 碱性阳离子的性质

离 子	原子序数	离子半径 ( $\text{\AA}$ )	水合自由能(kcal/mol)
$Li^+$	3	0.60	-98
$Na^+$	11	0.95	-72
$K^+$	19	1.33	-55
$Rb^+$	37	1.48	-51
$Cs^+$	55	1.69	-47

还未能原子水平上仔细分析一个明显的 $Na^+$ 选择性运输物，但可以推测其结构的一个关键方面。与 $K^+$ 的离子半径 ( $r = 1.33\text{\AA}$ ) 相比较，这样一个运输物一定会利用 $Na^+$ 的较小的离子半径 ( $r = 0.95\text{\AA}$ )。负电性的氧原子接近 $Na^+$ 比接近 $K^+$ 更紧，这样就能克服从水中移走 $Na^+$ 的较高代价。我们的预测是： $Na^+$ 专属部位有高密度的负电荷，并具有合适 $Na^+$ 容纳于这种集团中的几何形状。相反， $K^+$ 的专属部位预期会有较低密度的负电荷和具有不太适于阳离子和配位基团形成非常短的键的几何形状。

缬氨霉素分子的柔性（见图36-24）也是值得注意的。 $K^+$ 的整合是逐步进行的过程，即 $K^+$ 的水合层中的水分子是逐步地被抗菌素中的氧原子所取代。当旧键正断裂时，新的键正在形成，所以结合的活化障碍小。同样，其相反过程释放的活化能也小。因此，缬氨霉素在一秒钟内能多次结合和释脱 $K^+$ 。在此，柔性的重要如同在酶作用中一样，是明显的。

## 穿过膜中单一通道的离子流动可被检测

含有非常少量短杆菌肽 A 的平面双层膜的传导性不是恒定的。海登, D. (Denis Haydon) 发现, 这种膜对  $\text{Na}^+$  的传导以量子化的方式随时间而波动 (图36-26)。传导中的这些阶梯产生于短杆菌肽通道的自发地打开和关闭。一个单一通道保持开放大约一秒钟。这个通道对一价阳离子是高度可通透的, 但对二价阳离子或阴离子则不是。事实上, 多于  $10^7$  个离子能在一秒钟内穿过一个单一通道。这个运输速度比穿过纯水的扩散速度仅低10倍。相反, 扩散性载体的最大运输速度是每秒钟少于  $10^3$  个离子, 因为在膜中这些运输物的旋转和平移至少需要一毫秒。

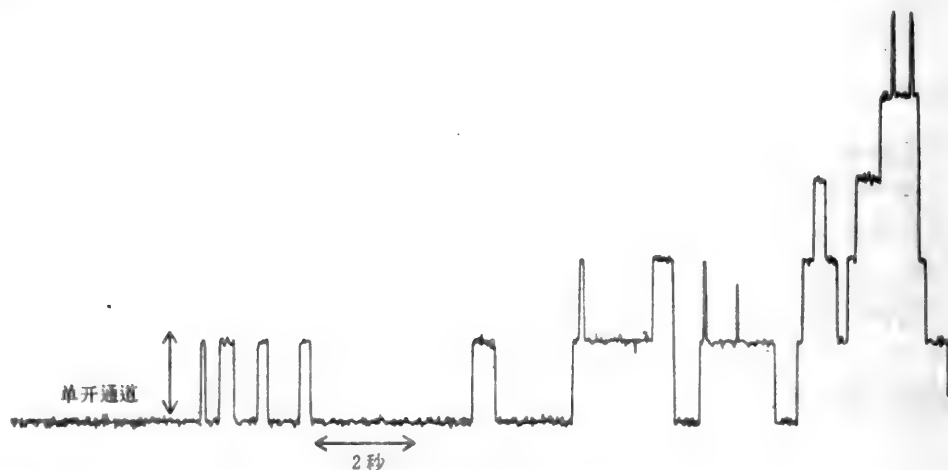
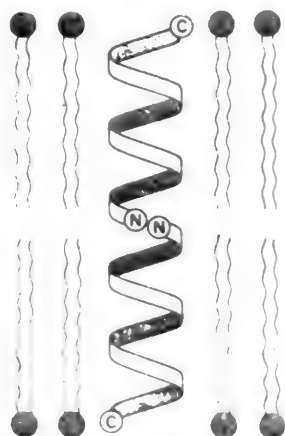


图36-26 含有少数几个短杆菌肽 A 分子的脂类双层膜的传导性以阶梯的方式波动。传导中最小的一步来自一个单一开放通道。[蒙 Dr. Olaf Anderson 特许。]

光谱法和 x 射线晶体学的研究揭示: 一个穿膜通道由二个短杆菌肽 A 分子构成 (图36-27)。这个传导性的螺旋二体在膜中与无传导性的单体相互平衡。事实上, 图36-26 中的传导



阶梯相当于二体的形成和解。二体含有一个被极性肽基团围住的直径为 4 Å 的含水通道。相反, 疏水侧链处于通道的周边, 与膜磷脂的碳氢链接触。当阳离子通过通道时围绕着含水壁孔的羧基暂时地与阳离子配位。x 射线研究指出: 通道与阳离子结合时变得较短较宽, 这再一次强调了运输分子的动态本质。

图36-27 二个多肽链在其 N-甲酰端相互结合所形成的短杆菌肽 A 通道的示意图。每条链折叠成  $\beta$  螺旋, 就像一个卷起的  $\beta$  折叠片层。这个模型是尤里, D. (Dan Urry) 提出的。[依据 S. Weinsrein, B. A. Wallace, E. R. Blout, J. S. Morrow, and W. Veach, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76 (1979): 4230。]

## 间隙接头允许离子和小分子在通讯细胞间流动

在许多原核细胞和真核细胞的生物膜中存在着大的含水通道以便进行非主动运输。例如，革兰氏阴性细菌的外膜含有由孔蛋白形成的通道，孔蛋白是37kda的跨膜蛋白质(612页)。这些10 Å直径的通道使质量小于600dal的极性分子容易进入周质空间。然后，这些分子通过同向转运、基团移位分子和其他透酶被运入胞液。同样，线粒体和叶绿体的外膜也含有大的含水通道，后者由类似于孔蛋白的分子形成。

了解得最清楚的真核生物含水通道是间隙接头，也通称为细胞到细胞的通道，因为它是沟通许多相邻细胞内部间的渠道。间隙接头是雷维尔，J.-P. (Jean-Paul Revel) 和卡诺夫斯基，M. (Morris Karnovsky) 发现的，它们团聚于邻近细胞的质膜的某些分散区域。间隙接头片层的电子显微照片(图36-28)指出，它们由环绕在一个15—20 Å直径的孔洞周围的六个亚基组成。从切线视图看出(图36-29)，这些六体横跨相邻细胞间的间隔空间或间隙(因此得名间隙接头)。通过微量注射一系列荧光分子进入细胞并观察它们进入毗邻细胞，就可测定间隙接头的孔径尺寸。洛温斯泰因，W. (Werner Loewenstein) 发现，所有质量小于约1 kdal

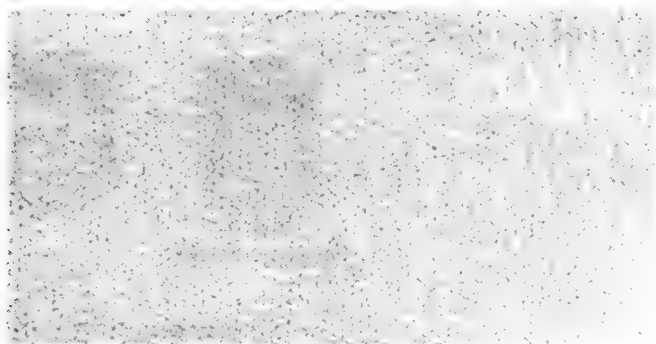


图36-28 分离的间隙接头片层的电子显微照像。圆柱体的连接器组成六边形网络，单位边长为85 Å。染色深的中心洞的直径为20 Å。[蒙Dr. Nigel Unwin and Dr. Guido Zampighi 特许。]

的极性分子能够迅速通过这些细胞-细胞间通道。换句话说，无机离子和大部分代谢产物(例如，糖、氨基酸和核苷酸)能在由间隙接头连在一起的细胞内部之间流动。相反，蛋白质、核酸和多糖由于太大，不能穿过这些通道。

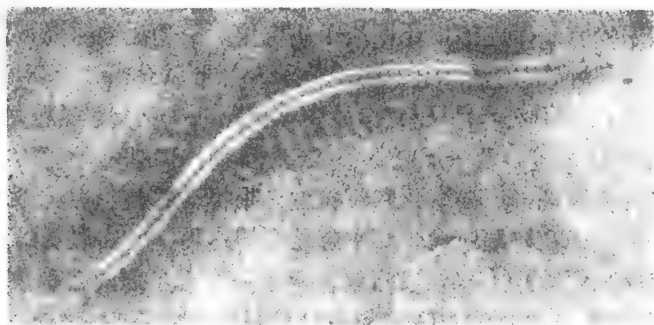


图36-29 由间隙接头连接起来的相邻细胞膜切线视图的电子显微照像。[引自E. L. Herzberg and N. B. Gilula, *J. Biol. Chem.* 254 (1979): 2143.]

间隙接头对于细胞间的通讯是重要的。一些可兴奋组织的细胞（例如心肌）是由离子穿过间隙接头的迅速流动而偶联起来，这保证它们能对刺激作出迅速和同步的反应。间隙接头对于远离血管的细胞，如在晶状体和骨骼中的营养也是必要的。这些通讯通道很可能在控制发育和分化中也是重要的。

间隙接头的通透性由钙离子调节。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平的提高导致间隙接头逐步的关闭。当 $\text{Ca}^{2+}$ 水平小于 $10^{-7} \text{ mol/L}$ 时这些通道充分打开，当该离子的水平高于 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时通道就关闭。随着 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度在这个范围内的提高，间隙接头的有效直径减小，以至它们首先对较大的分子成不通透的。二个四级状态的间隙接头片层的三维图象分析为这个逐步性关闭提供了一个结构基础。这些结构研究指出，间隙接头由二个并列的称为连接子的圆柱体单位组成，每个连接子由六个亚基组成。这个长 $75 \text{ \AA}$ 的连接子横跨质膜。连接子的长 $20 \text{ \AA}$ 的一段伸出至胞外空间，并在那里与来自相邻细胞的连接子相连。连接子中每个亚基的长轴相对跨膜的轴来说略呈倾斜。当这些亚基相互作用滑动运动以降低其倾斜时，通道就关闭（图36-31）。在通道的中心部分构象的变化最大，在那里并列的连接子的亚基相互之间滑动达到大约 $11 \text{ \AA}$

的距离，相当于旋转 $28^\circ$ 。更高分辨率的分析将揭示 $\text{Ca}^{2+}$ 怎样引起这种滑动和旋转。

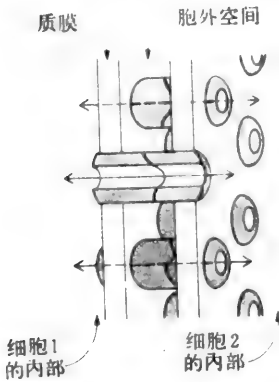


图36-30 间隙接头的示意图。

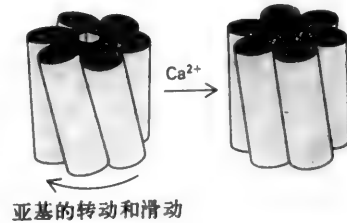


图36-31  $\text{Ca}^{2+}$ 使间隙接头逐步关闭的模型。[依据Dr. Nigel Unwin and Dr. Guido Zampighi热情提供的图。]

## 概 要

定向的跨膜蛋白质形成通道，以运输分子和离子穿过生物膜。对所运输的物质来说，如果 $\Delta G$ 是负的，则运输过程是被动的；如果 $\Delta G$ 是正的，则过程是主动的。自由能变化取决于所运物质的浓度比，如果物质是带电的，还取决于膜电位。主动运输需要输入自由能。动物细胞中最普遍的运输系统是 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵，它水解一分子ATP可以泵出3个 $\text{Na}^+$ 离子和泵入2个 $\text{K}^+$ 离子。有 $\text{Na}^+$ 存在时，ATP使 $\alpha_2\beta_2$ 酶复合物中 $\alpha$ 亚基的一个天冬氨酸侧链磷酸化。这个磷酸化的中间体在 $\text{K}^+$ 存在时水解。后一反应受强心类固醇，例如毛地黄所抑制，这类化合物是这个泵的高度专属的抑制剂。由磷酸化和脱磷酸作用推动的构象变化循环造成的结果是 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 离子的运输。钙离子在控制肌肉收缩中起重要的作用，它由肌质网膜中一个不同的ATP酶系统运送。象在 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵中一样，在运输循环中一个天冬氨酸残基被磷酸化。 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 这两个运输系统都已从纯化的ATP酶和磷脂得到重建。

有些运输系统直接由离子的梯度推动，而不是由水解ATP推动。例如，葡萄糖和氨基酸

进入某些动物细胞的主动运输需要 $\text{Na}^+$ 的同时进入，这个过程叫协同运输。 $\text{Na}^+$ 和葡萄糖通过专属的同向转运一同进入。依次，这个偶联进入所需的 $\text{Na}^+$ 梯度又由 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ 泵来维持。细菌通常用 $\text{H}^+$ 代替 $\text{Na}^+$ 推动同向转运和反向转运。例如，由乳糖透酶进行的乳糖的主动运输与质子进入细菌的运动相偶联。推动力是电子通过呼吸链的流动所产生的质子移动力。细菌中另一个不同类型的运输过程是基团移位，其中溶质在运输中起了变化。磷酸转移酶系统能使几种糖磷酸化（例如，葡萄糖变为葡糖6-磷酸）并将它们带入细胞。在这个过程中，磷酸烯醇式丙酮酸是磷酸基的供体，此过程由三种酶和一个小的磷酸基-载体蛋白(HPr)所介导。

原核和真核细胞也含有允许离子和小的极性分子被动地扩散穿过膜的含水通道。例如，革兰氏阴性细菌外膜中的孔蛋白通道直径大约为10 Å。高等生物中许多相邻细胞是通过间隙接头连接起来。这些20 Å直径的通道使离子和大多数代谢物(例如，单糖，氨基酸和核苷酸)得以从一个细胞内部流入相邻细胞内。间隙接头通过 $\text{Ca}^{2+}$ 的作用关闭。这些并列细胞之间的传导对于细胞间的通讯是重要的。

运输抗菌素通过作为载体（例如缬氨霉素）或作为通道的形成体（例如短杆菌肽A）使膜对一定的离子成为可通透的。载体抗菌素是在它的中心腔中结合一个单一的金属离子的环形炸饼状的分子。它的碳氢化合物周边使复合物可以穿越膜的碳氢化合物内部。形成通道的抗菌素创设一个穿过膜的含水壁孔。

## 第37章 可兴奋膜和感觉系统

特定的化学或物理刺激能使许多细胞膜兴奋。神经轴突膜对于电刺激的反应，突触对于传递介质的反应，视网膜视杆细胞对光的反应，以及能动细胞对于吸引剂分子的反应，都是通过膜内可兴奋装置来传递的。这些过程和由可兴奋装置实现的其它过程的共同特征是：

1. 这些刺激是由一个高度专一的蛋白质受体所探识，这受体是**可兴奋膜的整合组分**。
2. 特定的刺激引起受体发生构象变化。其结果是膜的通透性或结合于膜的酶活性发生变化。许多反应被大大地放大了。

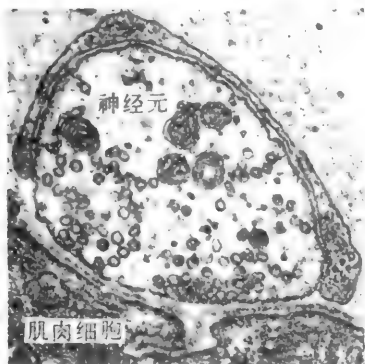


图37-1 突触的电子显微镜照片 (蒙Dr. C. Jack McMahan 特许)

3. 受体构象的变化和所引起的功能上的改变都是可逆的。有一些机制使受体回到休止状态并且恢复它的可兴奋性。

这一章涉及到四个类型的可兴奋装置。首先考虑神经轴突膜内的钠通道。这个电压敏感门参与了神经的动作电位。然后将转到化学调节的通道。在某些突触上乙酰胆碱受体使神经冲动得以传导。然后，重点转移到视网膜视杆细胞，这是一种非常灵敏的光探测器。将讨论视紫红质(即光感受器蛋白)把光转变为神经信号中的作用。本章最后的主题是趋化性，即细胞趋向吸引剂分子和离开拒斥剂的运动。

近几年来，关于化学感受器分子与细菌的运动器官的偶联已经有了许多了解。

### 动作电势由 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 通透性的暂时变化所介导

神经冲动是离子穿过神经元质膜的流动而产生的电信号。神经元和大部分其他的细胞一样，其内部有低浓度的 $\text{Na}^+$ 和高浓度的 $\text{K}^+$ 。这些离子梯度是由 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶泵所产生(672页)。在静止状态，神经轴突膜对于 $\text{K}^+$ 比对于 $\text{Na}^+$ 的通透性大得多，所以膜电势主要由内部与外部 $\text{K}^+$ 的浓度比决定(图37-2A)。未刺激的轴突中的 $-60\text{mV}$ 膜电势与仅对 $\text{K}^+$ 通透的膜所产生的 $-75\text{mV}$ 水平( $\text{K}^+$ 平衡电势)接近。当膜电势去极化超出了临界阈值(即从 $-60$ 到 $-40\text{mV}$ )，便产生神经冲动或动作电势。膜电势在约一毫秒之内变为正值，并在转回负值之前可达约 $+30\text{mV}$ 。这个放大的去极化作用沿神经末梢传播。在发现动作电势的性质中鱿鱼的大轴突起了重要作用。可将电极容易地插进这些异常大的轴突中去，它的直径约为一毫米，所以鱿鱼的轴突成了受喜爱的研究对象。

动作电势的机制是什么呢？霍奇金，A. (Alan Hodgkin) 和赫克斯利，A. (Andrew Huxley) 进行了有独创性的研究。他们发现，动作电势产生于轴突膜对 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 离子通透性的大而短暂的变化(图37-2B)。膜对 $\text{Na}^+$ 的传导首先发生变化。膜的去极化作用超过阈水平引起 $\text{Na}^+$ 通道的开放。由于跨膜的大电化学梯度，钠离子开始流进细胞。 $\text{Na}^+$ 的进入进一

步使膜去极化,以至对 $\text{Na}^+$ 打开了更多的门。这种去极化和 $\text{Na}^+$ 的进入之间的正反馈引起了膜电势的非常迅速和大的变化,在1毫秒内从约 $-60\text{mV}$ 到 $+30\text{mV}$ 。在约 $+30\text{mV}$ 时 $\text{Na}^+$ 的进入停止,因为这是 $\text{Na}^+$ 的平衡电势。换句话说,达到这个电势时驱动 $\text{Na}^+$ 进入的热力学推动力消失。约在这时, $\text{Na}^+$ 通道自动关闭,而 $\text{K}^+$ 门开始打开(图37-2B)。因而钾离子向内流动,以至膜电势回到负值。在大约2毫秒时,膜电势为 $-75\text{mV}$ ,这是 $\text{K}^+$ 的平衡电势。在几毫秒内随着 $\text{K}^+$ 的传导降低到未刺激状态的特征值时,它又恢复到 $-60\text{mV}$ 的静止水平。必须强调,在动作电势过程中,神经细胞中只有极小比例的钠和钾离子(百万分之一的数量级)流过质膜。换句话说,单次的神经冲动仅仅消费了 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 梯度的极小部分。显然,动作电势是高效的远距离的信号发送方法。

$\text{Na}^+$ 通道有利于 $\text{Na}^+$ 的通过,它超过 $\text{K}^+$ 11倍。这种选择性是如何达到的呢?这个问题的最后回答有待于通道结构的高分辨率分析。然而,对碱性阳离子和有机阳离子的相对通透性的电生理研究,提供了一些线索。通透性与离子的大小的相依性(表37-1)表明,通道是窄的。直径大于 $5\text{\AA}$ 的离子即被排斥。然而,传导不是全由大小决定。例如,甲胺( $\text{H}_3\text{CNH}_3^+$ )与胍( $\text{H}_2\text{NNH}_3^+$ )和羟胺( $\text{HONH}_3^+$ )有几乎相同的大小,然而前者通透性比其他小得多。这种差异的可能原因是:甲胺的甲基与胍的氨基或羟胺的羟基不同,

表37-1 轴突膜中钠和钾通道的相对通透性

离子	$\text{Na}^+$ 通道	$\text{K}^+$ 通道
$\text{Li}^+$	0.93	$<0.01$
$\text{Na}^+$	1.00	$<0.01$
$\text{K}^+$	0.09	1.00
$\text{Rb}^+$	$<0.01$	0.91
$\text{Cs}^+$	$<0.01$	$<0.08$
$\text{NH}_4^+$	0.16	0.13
$\text{OHNH}_3^+$	0.94	$<0.03$
$\text{H}_2\text{NNH}_3^+$	0.59	0.03
$\text{H}_3\text{CNH}_3^+$	$<0.01$	0.02

它不能与通道中的氧原子形成氢键。因此,甲胺与通道不符合。另一个重要的发现是:当降低pH时, $\text{Na}^+$ 通道对于所有通过的阳离子的传导显著地降低。事实上,相对通透性遵循 $\text{pK}$ 值为5.2的酸的滴定曲线,这提示:通道的活性形式含有一个带负电荷的羧化物基因。因此, $\text{Na}^+$ 通道提供一个具有小的半径并带负电荷的部位来选择 $\text{Na}^+$ 。 $\text{K}^+$ 离子则因为比 $\text{Na}^+$ 大而不易通过这个区域(图37-3)。

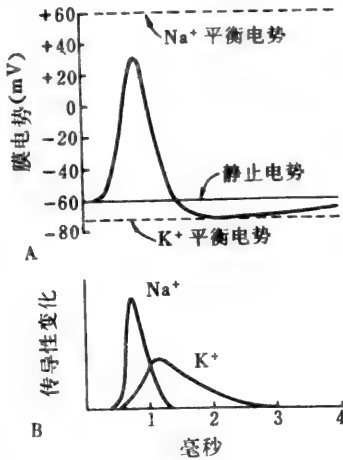


图37-2 神经轴突膜的去极化作用导致了动作电势。(A)膜电势变化的时间过程。(B) $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 传导性变化的时间过程。

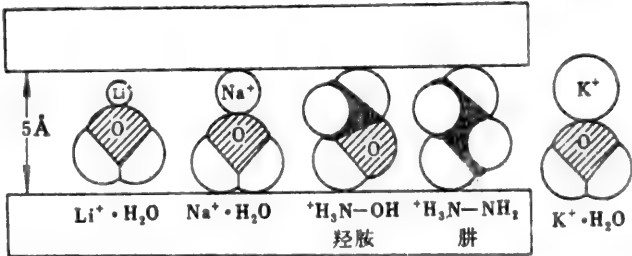
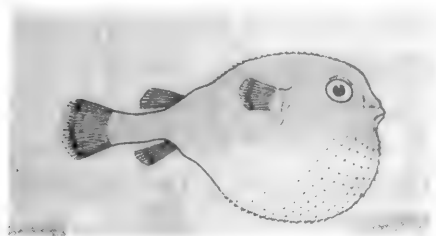


图37-3 钠通道的离子选择性部分地取决于空间因素。 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Li}^+$ 与水分子一起都符合通道,羟胺和胍也一样。相反,与水分子一起的 $\text{K}^+$ 太大了。[依据R. D. Keynes. Ion-channels in the nerve-cell membrane. © 1979 by Scientific American, Inc.]



## 河豚毒素和蛤蚌毒素阻塞神经轴突膜中的钠通道

**河豚毒素**是来自河豚鱼的高烈性的毒物，它阻塞神经冲动沿轴突和神经纤维的可兴奋膜中的传导，从而导致呼吸麻痹。



河豚鱼，在日本认为是一种美味

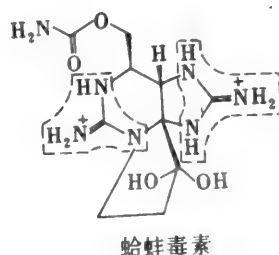
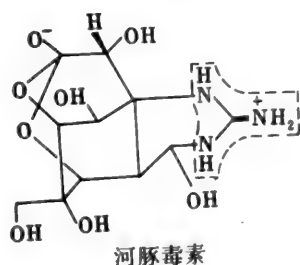


图37-4  $\text{Na}^+$ 通道的毒物。

河豚毒素和蛤蚌毒素是非常有用的探针，因为它们对 $\text{Na}^+$ 通道具有专属性和高亲和力。例如，通过测量高放射性的河豚毒素的结合作用，已经确定了在各种可兴奋膜中 $\text{Na}^+$ 通道的密度。没有髓磷脂绝缘鞘的无髓神经纤维，具有典型的低密度的 $\text{Na}^+$ 通道，其数量级为每平方微米20个。在这些轴突的膜中， $\text{Na}^+$ 通道相距大约2000Å。相反，有髓神经纤维中，在专门的叫作“郎飞结”区域中通道的密度非常高，数量级为每平方微米 $10^4$ 个。这些结相隔2mm，具有髓神经的轴突膜唯一暴露于细胞外液的部分。在结与结之间的轴突膜中通道的密度非常低，并且不参与传导。更确切地说，动作电势在结与结之间跳跃，所以冲动传导比在无髓纤维中更加迅速和高效。在郎飞结上每平方微米有 $10^4$ 个通道，这意味着：在这个区域中，大部分膜的面积被 $\text{Na}^+$ 通道占据。

在纯化 $\text{Na}^+$ 通道过程中也利用了河豚毒素的专属结合作用。可兴奋膜中的膜本体蛋白可用去垢剂

小鼠的致死剂量约是 $0.01\mu\text{g}$ 。河豚毒素是非常有用的探针，因为它是高度专一的。它与 $\text{Na}^+$ 通道非常紧密地结合( $K \sim 10^{-9}\text{mol/L}$ )，并阻塞钠离子的流动，但它不影响 $\text{K}^+$ 通道。蛤蚌毒素由海生的双鞭甲藻产生，它以相同的方式作用。食用双鞭甲藻的贝壳类动物，特别是蛤和淡菜都是有毒的。甚至一个小淡菜可能含有足以使50人致死的蛤蚌毒素！河豚毒素和蛤蚌毒素的共同特征是有一个胍基(图37-4)。毒素的这个带正电荷基团与膜的细胞外侧通道口上的带负电荷的羧化物相互作用。实际作用是，这些毒素是 $\text{Na}^+$ 的竞争性抑制剂。

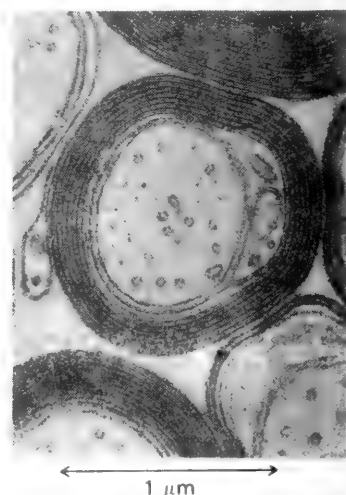


图37-5 脊索有髓轴突的电子显微照片。髓磷脂是轴突四周的膜状包裹，它起绝缘层作用。有髓神经的传导速度比相同直径的无髓神经高得多。[蒙Dr. Cedric Raine特许。]



加以溶解，并通过离子交换层析将它们分离。利用河豚毒素与溶解了的 $\text{Na}^+$ 通道的结合，使蛋白质在纯化过程中得到检测。用这个方法分离出的 $\text{Na}^+$ 通道是由几个类型的亚基组成的230kda蛋白质。通道有高复杂性，部分原因可能是：它除了含有高选择的孔外，还含有电压感觉单位。这个单位中的带电基团在动作电势过程中响应膜电势的变化，并向孔传递这个信息。事实上，已经检测到钠离子流动之前蛋白质中带电基团的运动所产生的“闸制”电流。

## 乙酰胆碱是神经传递介质

神经细胞在叫做突触的接头上与其他神经细胞相互作用（图37-6）。神经冲动借化学传递介质被传递越过大部分突触，这些介质是可扩散的小分子，例如乙酰胆碱和去甲肾上腺素。乙酰胆碱也是运动终板（神经肌肉接头）处的传递介质，终板是神经和横纹肌之间的接点。

胆碱能突触（即用乙酰胆碱作为神经传递介质）的突触前膜由一个约500Å的间隙与突触后膜分开，这个间隙叫突触间隙。突触前轴突的末端充满含乙酰胆碱的突触泡。神经冲动的到达导致乙酰胆碱释放进入间隙。然后乙酰胆碱分子扩散到突触后膜，并在那里与专一的受体分子结合。这引起突触后膜的去极化，作用沿第二个神经细胞的电兴奋膜传播。乙酰胆碱由乙酰胆碱酯酶水解，于是恢复了突触后膜的极化作用。

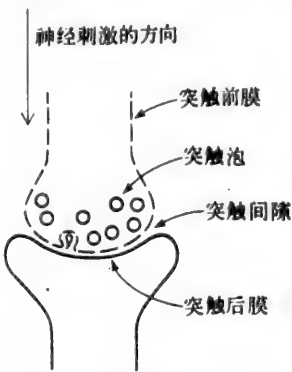
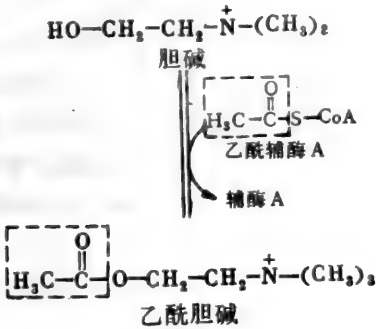


图37-6 胆碱能突触的示意图。

乙酰基从乙酰辅酶A转移到胆碱而生成的乙酰胆碱是在轴突的接近突触前端点处合成的。



这个反应由胆碱乙酰转移酶（胆碱乙酰化酶）催化。然后，一些乙酰胆碱被突触泡吸收，而剩余部分停留在胞液中。胆碱能突触泡的典型直径是400Å，它含有约10,000个乙酰胆碱分子。从神经组织的匀浆中分离得到了突触体，这促进了对突触功能的研究。突触体是修剪后重新封闭的突触前末端。它们由被完整的突触前膜包围的线粒体、胞液和突触泡组成。

## 乙酰胆碱打开突触后膜中的阳离子门

突触后膜或运动终板的静止电势大约是-75mV。乙酰胆碱与专属受体的相互作用使这些膜的通透性发生很大的变化（图37-7）。在0.1毫秒内， $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的传导都显著地提高，出现一个大的 $\text{Na}^+$ 向内电流和较小的 $\text{K}^+$ 向外电流。向内的 $\text{Na}^+$ 电流使突触后膜去极化并在邻接的轴突或肌肉膜中引起动作电势。乙酰胆碱打开的是单一类型的阳离子通道，这个通道对于 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的通透几乎是相等的。由于 $\text{Na}^+$ 的跨膜电化学梯度更陡一些，所以 $\text{Na}^+$ 的流动比 $\text{K}^+$

的流动大。

二个乙酰胆碱分子与一个受体结合，并引起能打开通道的构象变化。一个符合实验数据的动力学解释是：

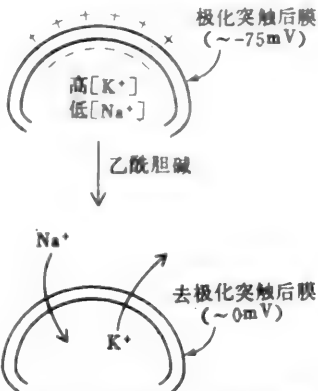


图 37-7 乙酰胆碱通过提高 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的传导使突触后膜去极化。



其中A是乙酰胆碱分子，R是关闭的通道， $\text{R}^*$ 是开放的通道。在其毫秒级寿命中流过一个单开放通道的离子约有 $10^4$ 个。受体长时间暴露于乙酰胆碱引起它的脱敏作用，即在一段长时间间隔中通道关闭，并对乙酰胆碱不起反应。

### 乙酰胆碱以小包装形式被释放

卡茨，B. (Bernard Katz) 进行了在神经肌肉接头处神经冲动传导的研究，结果揭示：乙酰胆碱从突触前膜以小包装形式被释放，其中含有的分子约在 $10^4$ 数量级。分析运动神经终板的膜电势，即使连接的神经未受刺激时它也表现自发的电活性，这证明乙酰胆碱有量子式的释放。振幅为 $0.5\text{mV}$ ，持续约20毫秒的去极化脉冲间歇地发生。这些小型终板电势随机产生，其概率长时期保持不变。小型终板电势是由自发地释放单个突触泡而产生。由动作电势引起的终板完全去极化是由不到1毫秒内约一百个乙酰胆碱小包装的同步释放造成的。被释放的小包装的数量取决于突触前膜的电势。换句话说，乙酰胆碱的释放是电控制的分泌形式。乙酰胆碱的释放依赖于细胞外液中 $\text{Ca}^{2+}$ 的存在。突触前膜的去极化导致 $\text{Ca}^{2+}$ 的进入，这促使突触泡膜和突触前膜的暂时性融合。

### 重建的膜泡加入乙酰胆碱时成为阳离子可通透性膜

最近在纯化乙酰胆碱受体和在重建有功能的膜泡方面已经取得了相当大的进展。一个值得选用的起始材料是电鱼（例如电鳗）的电器官，它含有丰富的胆碱能突触后膜。电器官由叫做电板的细胞柱组成。细胞的一侧（称受神经支配面）接纳一个神经末梢，是电兴奋性的。另一侧（称不受神经支配面）是高度迭皱的，是电不兴奋性的。受刺激的电板所产生的电压来自它的两侧的反应的不对称性。电鱼，例如Electrophorus，受到刺激时其受神经支配一侧的膜电势从 $-90$ 变到 $+60\text{mV}$ ，而不受神经支配的一侧则保持在 $-90\text{mV}$ 。因而，在动作电势的高峰处两个面外侧之间的电势是 $150\text{mV}$ （图37-8）。电器官中的电板是串联式地排列，所以它们的电压是相加的。因此，一个含



电鳗，*Electrophorus electricus*

5,000排电板的器官能产生750V的放电。有趣的是，电鳗鱼的电板是从肌肉细胞演化而来。它们保持着肌肉的电兴奋外膜，但失去了收缩设施。Electrophorus的电器官是钠通道的极好来源。

还有另一种奇特生物材料是非常宝贵的分离乙酰胆碱受体的来源。为了在大分子的混合物中能准确地辨认受体，必须将受体进行特殊标记。使用蛇的神经毒素，例如使用α-金环蛇毒素，已达到了这个目的，这个毒素来自台湾蛇的毒液，或使用眼镜蛇毒素。这些神经毒素与运动终板上或电器官中电板的受神经支配面上的乙酰胆碱受体结合，从而阻断神经肌肉的传导。这些毒素是小的碱性蛋白质

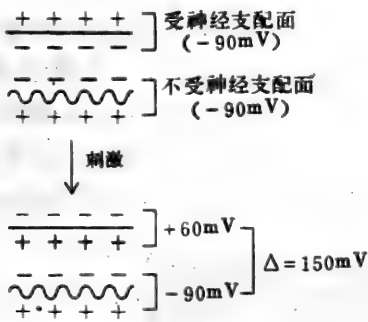


图37-8 电鳗的电板细胞电压的产生。

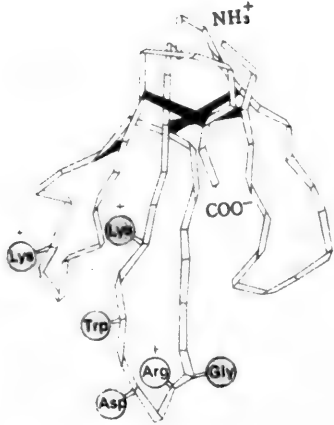


图37-9 乙酰胆碱受体的神经毒素抑制剂的三维结构。这个毒素来自一种海蛇。  
[蒙Dr. Demetrios Tsernoglou and Dr. Gregory Petsko特许。]

(7kdal)。用<sup>125</sup>I 碘化毒素或用磷酸吡哆醛与毒素形成希夫碱，然后再用<sup>3</sup>H-氢硼化物将它还原，使这些神经毒素具有放射性。标记的眼镜蛇毒素与乙酰胆碱受体结合紧密，解离常数为10<sup>-9</sup> mol/L。最重要的是，它不与突触后膜中的其它大分子结合。因此，乙酰胆碱受体能专一地用放射性标记加以标志。

向膜碎片中加非离子去垢剂（例如吐温80，它是聚氧乙烯的衍生物），可使电器官的乙酰胆碱受体溶解。所得溶解的提取物可通过凝胶过滤和离子交换层析分级分离。最后一步是用含有共价结合眼镜蛇毒素的柱子进行亲和层析，就能完成受体的10,000倍纯化。乙酰胆碱受体是由四种亚基复合形成，分子量为270kdal。用含三甲铵基的活泼化合物能亲和标记其40kdal亚基，这表明，这个亚基具有乙酰胆碱的结合部位。如向受体的溶液中加入磷脂，然后再透析除去去垢剂，就可形成含有纯化乙酰胆碱受体的膜泡。被捕集于重建膜泡内部水性空间的放射性钠离子（<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>），在加入乙酰胆碱或类似物（例如氨甲酰胆碱）时，被释放出来（图37-10）。金环蛇毒素和已知的乙酰胆碱的拮抗物能阻断释放，这说明：释放是由乙酰胆碱与其结合在膜上的受体之间专属的相互作用所媒介。

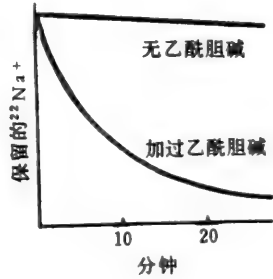
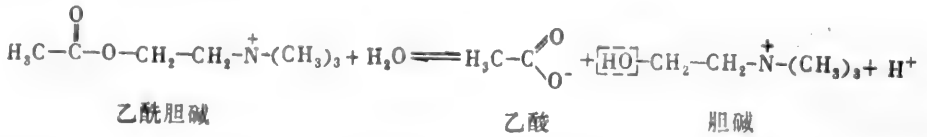


图37-10 乙酰胆碱使含乙酰胆碱受体的重组膜泡释放Na<sup>+</sup>。

## 乙酰胆碱的迅速水解和终板重极化

为了恢复突触后膜的可激发性，必须切断去极化信号。乙酰胆碱被乙酰胆碱酯酶水解为乙酸和胆碱，这个酶是纳克曼索恩，D. (David Nachmansohn) 在1938年发现的。突触后膜的通透性被恢复，膜即被重极化。



乙酰胆碱酯酶位于突触间隙中,在那里它结合于突触后细胞产生的胶原和氨基葡聚糖的网络上。这个260kDa的酶具有 $\alpha_2\beta_2$ 结构,可从乙酰胆碱受体上容易地分离出来。乙酰胆碱酯酶一个显著的特征是它有非常高的转换数,其值为 $25,000\text{秒}^{-1}$ ,这意味着,它在40微秒内裂解一个乙酰胆碱分子。酶的高转换数对于迅速恢复突触后膜的极化状态是必要的。只有当突触后膜在不到1毫秒的时间内即能恢复它的极化时,突触才能每秒钟传导1,000个脉冲。

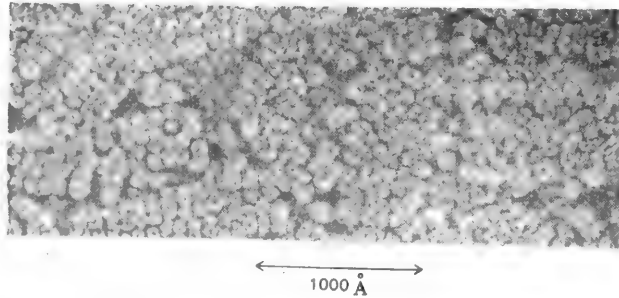


图37-11 突触后膜中乙酰胆碱受体的电子显微照片。[蒙Dr. John Heuser and Dr. Steven Salperer 特许。]

乙酰胆碱酯酶的催化机制类似于糜蛋白酶的机制。乙酰胆碱与乙酰胆碱酯酶活性部位的特定的丝氨酸残基作用，形成共价的乙酰-酶中间体，并且释放胆碱。然后，乙酰-酶中间体与水反应形成乙酸并重新形成自由的酶（图37-12）。

酶-Ser-OH

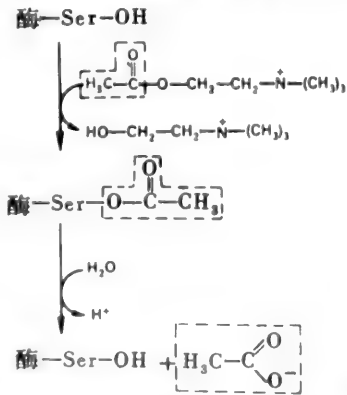
$$\left[ \text{H}_2\text{C}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3 \right]$$


图37-12 乙酰胆碱酯酶的催化机制

乙酰胆碱酯酶的抑制剂可用作药物和毒物

乙酰胆碱酯酶抑制剂在治疗上的性质和有毒的性质有重要的实际意义。毒扁豆碱是从加拉巴豆属植物中得到的生物碱，它一度被用作巫术审判中的神裁法毒物。毒扁豆碱及相关的抑制剂，例如新斯的明，都是氨基酯（图37-13）它们通过与乙酰胆碱酯酶形成一个非常

缓慢地被水解的共价中间体从而抑制乙酰胆碱酯酶。新斯的明与乙酰胆碱酯酶结合时，它的带正电荷的三甲铵基团处于酶的阴离子部位，而它的氨甲酰基靠近酯部位的活性丝氨酸残基。然后，酶被氨甲酰化，而醇的部分被释放。氨甲酰-酶中间体随后以非常缓慢的速度水解，这与乙酰-酶中间体形成对比。于是，就有效地封阻了酶的活性部位。新斯的明可用以治疗青光眼，青光眼是表现为眼内压异常高的一种眼病。治疗的基本原理是，新斯的明抑制乙酰胆碱酯酶，从而提高乙酰胆碱的作用。

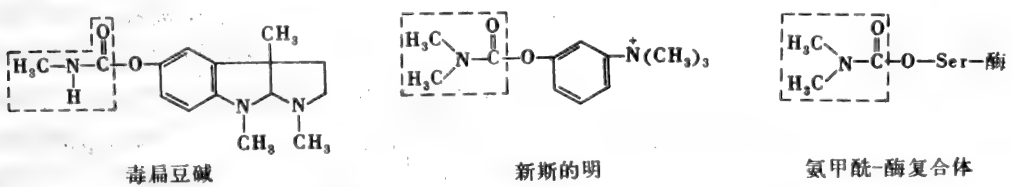


图 37-13 毒扁豆碱和新斯的明使乙酰胆碱酯酶活性部位的丝氨酸氨甲酰化，从而抑制该酶。

更有效的抑制剂是有机氟磷酸盐，例如二异丙基磷酸氟化物 (DIPF)。这些化合物与乙酰胆碱酯酶反应，形成非常稳定的共价磷酸-酶复合物 (图 37-14)。磷酸基与活性部位的丝氨酸结合，犹如 DIPF 与丝氨酸蛋白酶的反应情况一样。

为了用做农业杀虫剂或者用做化学战中的神经毒气，已经合成了许多有机磷酸盐化合物 (图 37-15)。这些化合物引起呼吸麻痹而能致死。

塔崩 (tabun) 和萨林 (sarin) 属于这些化合物中最毒的。对硫磷已经广泛用做农业杀虫药剂。

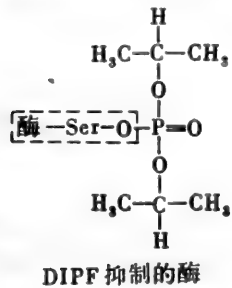


图 37-14 DIPF 抑制的乙酰胆碱酯酶。

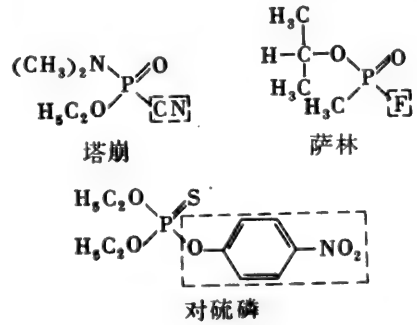


图 37-15 乙酰胆碱酯酶的一些有机磷酸盐抑制剂的结构。

以放射性 DIPF 作为标记，计数了小鼠膈膜的终板中乙酰胆碱酯酶分子的数量。其密度是  $12,000 \mu m^{-2}$ ，这与使用放射性神经毒素而发现的乙酰胆碱受体的密度是非常相似的。因此，乙酰胆碱酯酶和乙酰胆碱受体两者在突触后膜上都有非常密集的排列。以低频率传递神经脉冲时仅需一小部分乙酰胆碱酯酶。然而，在维持高速点火脉冲的传递时大部分酶分子必须是活性的。

### 为有机磷中毒设计的一个解毒药

被有机磷酸盐，例如 DIPF，抑制的乙酰胆碱酯酶可用羟胺 ( $NH_2OH$ ) 衍生物加以再激

活。威尔逊, I. (Irvin Wilson) 发现, 羟胺能使结合于被抑制的酶中丝氨酸残基上的磷酸基释放, 因而能再激活酶 (图37-16), 是解毒药发展的起点。要解决的问题是使这个反应适用于治疗。羟胺不能在活体内使用, 因为再激活被DIPF抑制的乙酰胆碱酯酶所需要的高浓度羟胺是有毒性的。威尔逊的路线是寻找一种既保留羟胺的化学反应性, 又对乙酰胆碱酯酶有专属性和极高亲和性的化合物。已知酶有一个阴离子部位, 它是针对乙酰胆碱中带正电荷的胆碱部分的, 因此似乎值得花精力去合成含有季铵基的羟胺衍生物。取代基应该在羟胺的氧原子上还是氮原子上呢? 他发现, 作为再激活剂的O-甲基

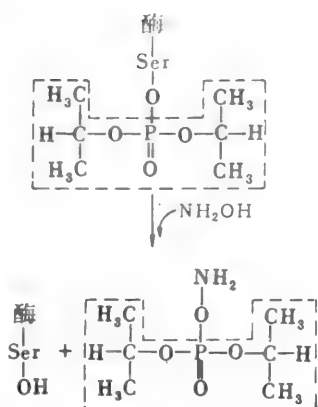
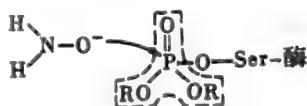
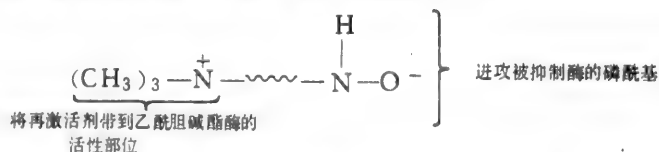


图37-16 羟胺对DIPF抑制的乙酰胆碱酯酶的再激活。

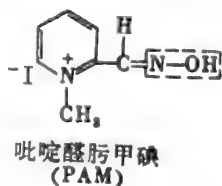
羟胺无活性, 而N-甲基羟胺是有活性的。再激活剂中的羟基不能被替换, 因为它是在被抑制酶中攻击磷原子的阴离子。



下一步, 也是决定性的一步, 是将季铵基放置在与亲核氧原子距离合适的位置。而且, 这些基团的取向必须与被抑制的酶中阴离子部位和磷原子互补。



许多含有季铵基和羟胺功能的化合物被作为再激活剂加以试验。最有效的一个是2-吡啶腈肟甲碘 (PAM)。这个化合物有明确的几何形状, 因为肟中的双键有助于将氧原子固定在环平面中。



PAM以与羟胺作用非常相似的方式再激活被DIPF抑制的乙酰胆碱酯酶。然而,  $10^{-6}$  mol/L 的PAM与 1 mol/L 的羟胺一样有效。这个百万倍的提高使PAM能在医疗上用以治疗有机磷中毒。PAM令人惊异的效力是因为季铵基相对于亲核的氧原子来说处在最适宜的位置。PAM的发展是合理地设计药物工作中的一个里程碑。

## 乙酰胆碱受体的抑制剂

直接作用于乙酰胆碱受体的化合物也能损害神经肌肉的传导。南美印第安人使用箭毒已经很多世纪了。在哥伦布返回大陆不久，丹吉纳(d' Anghera)写了《De Orbe Novo》一书，其中他记录着“土著人用能致人于死地的草药汁在他们的箭上布毒……”。箭毒的一个活性组分是d-管箭毒碱(图37-17)。管箭毒碱通过与乙酰胆碱竞争，夺得与乙酰胆碱受体结合，而抑制终板的去极化作用。 $\alpha$ -金环蛇毒素和

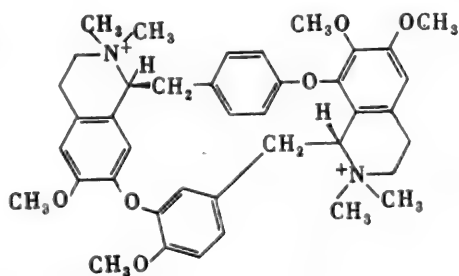
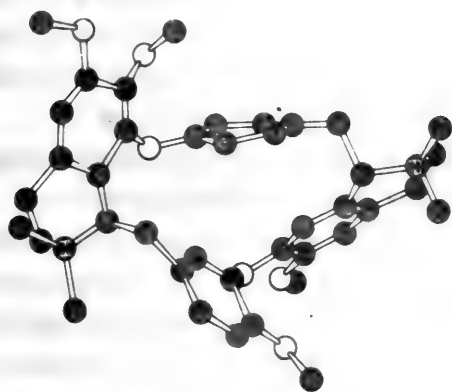
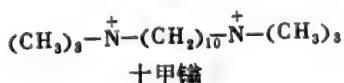
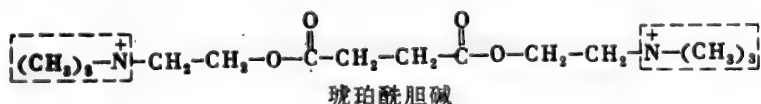


图37-17 d-管箭毒碱的化学式和模型。

眼镜蛇毒素有相似的作用。相反，象十甲镆那样的化合物与受体结合并引起终板的持久性去极化作用。



琥珀酰胆碱是乙酰胆碱的一个类似物，在外科处理中用以引起肌肉松弛。



突触后膜中的乙酰胆碱酯酶非常缓慢地水解琥珀酰胆碱。因而引起终板的持久性去极化。血浆和肝脏中的不很专一的胆碱酯酶亦可水解琥珀酰胆碱，这些酶称为血浆胆碱酯酶或拟胆碱酯酶以区别于突触后膜的乙酰胆碱酯酶。琥珀酰胆碱的一个吸引人的特征是，当这个药的输注一停止，神经肌肉的传导立刻恢复。然而，在一小部分病人中，肌肉松弛和呼吸麻痹可持续许多小时。在这样的病人中，琥珀酰胆碱以非常缓慢的速度水解，因为他们的血浆胆碱酯酶对琥珀酰胆碱有显著减少的亲合力。对琥珀酰胆碱的敏感性如同对扑疟喹啉的敏感性一样(263页)，是由遗传所决定的药物特异反应性的一个例子。

将兔子用纯化的乙酰胆碱受体免疫几个星期以后，它呈现肌肉虚弱和疲劳。这些兔子产生出抗体，后者与神经肌肉接头处的乙酰胆碱受体相反应。结果，减少了有功能的乙酰胆碱受体的数量，从而导致了神经肌肉传导的不完全。这些兔子表现出的症状非常像重症肌无力

病（一种人类疾病）的症状 确实，肌无力病人的血清中含有对抗他们自己的乙酰胆碱受体的抗体。换句话说，重症肌无力是一种自体免疫病症，其中自体变成了免疫系统的靶。

## 儿茶酚胺和 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 也是神经传递介质

除了乙酰胆碱之外，已经鉴别了另一些神经传递介质。一个确认的神经传递介质应符合几个标准。首先，将假定的传递介质微量注入突触间隙所引起的反应必须与突触前神经兴奋

所引起的反应相同。第二，这个物质必须在突触前神经末梢含量丰富。在这一点上，能将含有所称传递介质的突触泡分离出来是最强的证据。第三，突触前神经必须在正确的时间释放这些假设的传递介质，并且在数量上足以作用于突触后神经。

有几种儿茶酚胺符合这些标准。例如，去甲肾上腺素是由交感神经纤维支配的平滑肌接头处的传递介质，与乙酰胆碱作为副交感神经接头处的传递介质形成对比。肾上腺素和多巴胺是另外的两个儿茶酚胺传递介质。事实上，这些儿茶酚胺是在交感神经末梢中和肾上腺中从酪氨酸合成的（图37-18）。第一步是限速步骤，酪氨酸羟化形成3,4-二羟苯丙氨酸（多巴）。酪氨酸羟化酶催化这个反应，这种酶很象苯丙氨酸羟化酶。四氢生物喋呤是辅因子，它激活分子氧。第二步是多巴脱羧酶使多巴进行脱羧作用，产生3,4-二羟苯乙胺（多巴胺），多巴脱羧酶是一个磷酸吡哆醛酶。然后，一个含铜的羟化酶羟化多巴胺形成去甲肾上腺素。最后，一个利用S-腺苷甲硫氨酸的转甲基酶使去甲肾上腺素甲基化，形成肾上腺素。

儿茶酚胺神经传递介质可通过甲基化儿茶酚环的3-羟基而失活。这个反应由儿茶酚-O-转甲基酶催化，它利用S-腺苷甲硫氨酸作为甲基的供体。或者，通过单胺氧化酶氧化除去它们的氨基，也能使这些神经传递介质失活（图37-19）。

另一个氨基酸衍生物也已证明是一个神经传递

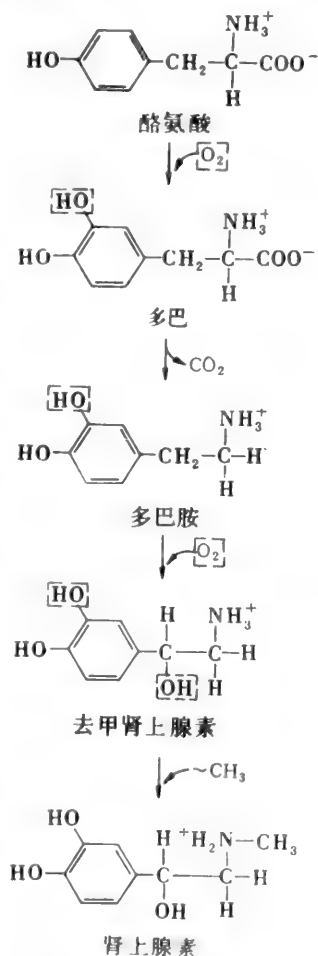


图37-18 儿茶酚胺神经传递介质的合成途径。

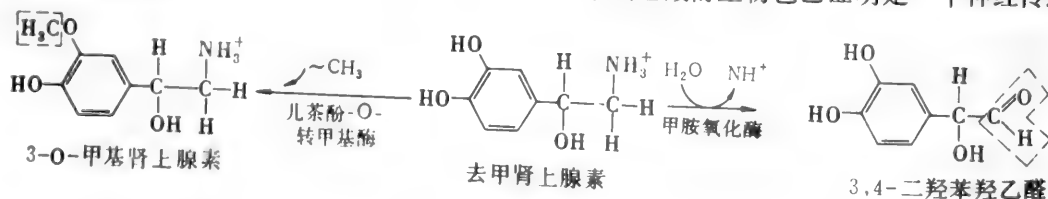


图37-19 去甲肾上腺素的失活。



介质。 **$\gamma$ -氨基丁酸**（也叫GABA）能提高突触后膜对 $K^+$ 的通透性。因此， $\gamma$ -氨基丁酸驱动膜电势离开引起动作电势的阈值，所以它是一个抑制性传递介质。谷氨酸脱羧后形成 $\gamma$ -氨基丁酸，这个反应由谷氨酸脱羧酶催化（图37-20）。正如所料，磷酸吡哆醛是这个脱羧酶的辅基。 $\gamma$ -氨基丁酸经转氨作用生成琥珀酸半醛而失活，然后琥珀酸半醛氧化形成琥珀酸。

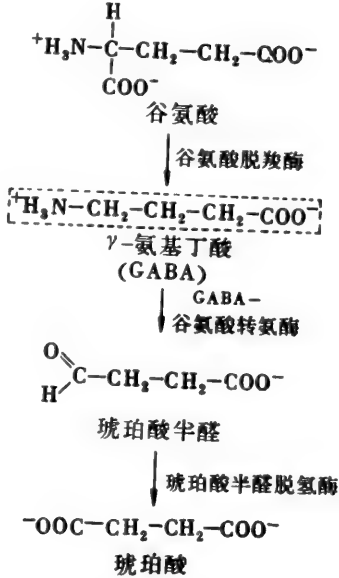


图37-20  $\gamma$ -氨基丁酸的合成和失活。

### 单个光子能激发视网膜的视杆细胞

现在我们转到讨论光激活的可兴奋感受器。在人体中有两类光受器细胞，由于它们的不同形状而被称为视杆细胞和视锥细胞。视锥细胞在明亮的光中起作用，并负责色视觉，而视杆细胞在暗光中起作用，它不能察觉颜色。在人体视网膜中有三百万个视锥细胞和十亿个视杆细胞。这些光受器细胞把光转化成原子运动，再转化成神经冲动。视杆细胞和视锥细胞与双极细胞形成突触，双极细胞又与视网膜中的其他的神经细胞相互作用。由光受器产生的电信号由视网膜中错综排列的神经细胞加工，然后由视神经纤维输送到大脑。因此，视网膜有双重作用：把光转变成神经冲动，并整合视觉信息。

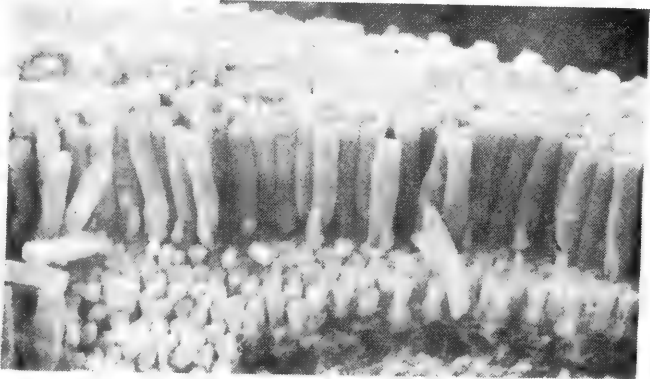


图37-21 视网膜视杆细胞的扫描电子显微照片。[蒙Dr. Deric Bownds特许。]

1938年，赫克特，S. (Selig Hecht) 发现，单个光子能激发人的视杆细胞。让我们来探索一下这些细胞的绝妙的敏感性的分子基础。视杆细胞是细而长的结构，典型的形状是直径为 $1\mu\text{m}$ 和长度为 $40\mu\text{m}$ 。视杆细胞的主要功能在于非常明晰地区域化（图37-22）。视杆细胞的外段是专司光感受的，它含有约1000个堆集成层的圆盘（视盘）（图37-23），这些圆盘是封闭的约厚 $160\text{\AA}$ 的扁平囊。这些膜结构中密集地挤满了光受器分子。圆盘的膜与外段的质膜是分开的。一个细长的纤毛将外段与内段连接起来，后者含有丰富的线粒体和核糖体。内

段能极快地再生。此外，视杆细胞的外段中的圆盘仅生存10天，它们不断地新生。内段与细胞核邻接，核的另一边是突触体。突触体含有突触囊泡，突触囊泡再与双极细胞形成突触。



图37-22 视网膜视杆细胞的示意图。

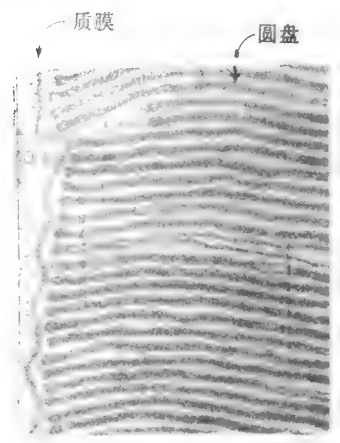


图37-23 视杆细胞外段的电子显微照片，显示出圆盘的堆层。[引自John E. Dowling, *The organization of vertebrate visual receptors*, In *Molecular Organisation and Biological Function*, John M. Allen, ed, (Harper & Row, 1967).]

### 视紫红质是视杆细胞的光感受蛋白

必须吸收光才能刺激光感受细胞。此外，当吸收光的基团(称生色团)吸收了一个光子以后必须经历一个构象的变化。视杆细胞中的光敏分子是视紫红质，它由视蛋白(一种蛋白质)和11-顺视黄醛(一种辅基)组成(图37-24)。

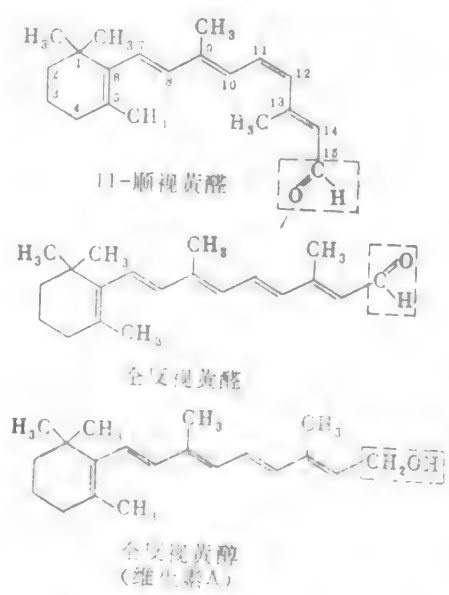


图37-24 11-顺视黄醛，全反视黄醛和全反视黄醇(维生素A)。

视紫红质是一个38kdal的跨膜蛋白质。它的氨基末端位于圆盘内的含水间隙中，而它的羧基末端位于圆盘膜的另一侧，即在胞液内。视紫红质的氨端区域含有两个寡糖单位，它们共价结合于天冬酰胺侧链上。这些糖可能在引导视紫红质从内段进到圆盘中起重要作用。象其他真核生物的膜蛋白一样，视紫红质也是由结合于内质网上的核糖体合成的。新合成的蛋白质在到达质膜以前被运送到高尔基器。通过质膜的内陷，在外段的底部形成新的圆盘，这就解释了为什么视紫红质的糖单位位于圆盘的内部，而当它们处于质膜上时它们是面向胞外空间的(图37-25)。

象其他没有辅基的蛋白质一样，视蛋白不

能吸收可见光。视紫红质的颜色和对光的感应是由于11-顺视黄醛的存在，这是一个很有效的生色团。11-顺视黄醛使视紫红质在可见光区域内有一个宽吸收带，其高峰在500nm，这个波长正好与太阳的输出相符合。视紫红质的可见光吸收谱带的强度也是值得注意的。视紫红质在500nm的消光系数是 $40,000\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ ，这是一个很高的值（图37-26）。视紫红质的可见光吸收谱带的整合吸收强度接近有机化合物可达到的最大值。11-顺视黄醛具有如此有利的生色性质是因为它是一个多烯烃。它的六个交错的单键和双键构成一个长的不饱和的电子网络。

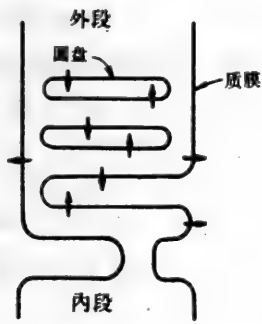


图37-25 质膜内陷形成圆盘。箭头指示视紫红质分子的极性。

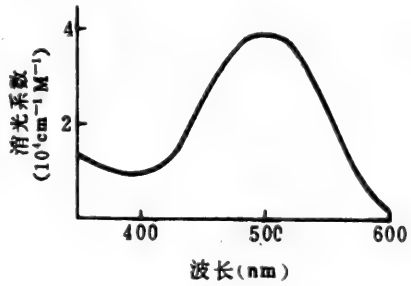
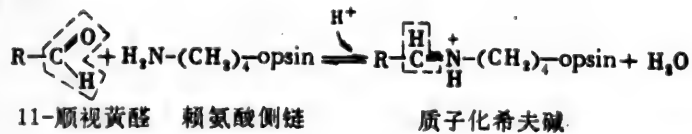


图37-26 视紫红质的吸收光谱。(图中M = mol/L)

11-顺视黄醛以希夫碱键结合于视紫红质上。它的醛基与视蛋白中一个特定的赖氨酸残基的ε-氨基相连。视紫红质的光谱性质表明，希夫碱是质子化的。



11-顺视黄醛的前体是全反视黄醇（维生素A），哺乳动物不能进行它的从头合成。全反视黄醇(图37-24)分两步转变成11-顺视黄醛。视黄醇脱氢酶将醇基氧化成醛,这个酶以NADP<sup>+</sup>为电子受体。然后，视黄醛异构酶使C -11和C -12之间的双键异构化，从反式构象变为顺式构象。缺少维生素A会引起夜盲，最终并会导致视杆细胞外段的退化。

### 光使11-顺视黄醛异构化

视兴奋中的最初事件是已知的。沃尔德，G. (George Wald)指出，光使视紫红质的11-顺视黄醛基团异构化形成全反视黄醛。这个异构化作用显著地改变了视黄醛的几何形状(图37-27)。视黄醛的希夫碱键相对于生色团的环状部分而言移动了约5 Å。实质上，光子已经转化成为原子运动。

视黄醛大部分的异构化发生在吸收光子的几微微秒之内，这点可从接受一个强烈激光脉冲后，出现一个新的吸收带的情形来说明。这个光解的中间体叫做深视紫红质（或前感光视

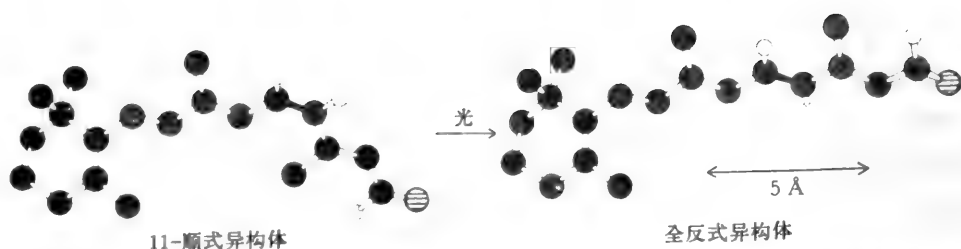


图37-27 视兴奋的最初事件是视黄醛希夫碱的11-顺式异构体异构化为全反式形式 C 11—C 12双键用黑色表示。

紫红质),它含有一个紧张态的全反式的生色团。视黄醛和蛋白质二者都继续地改变它们的构象,这可从一系列具有不同光谱性质的过渡态中间体的形成中反映出来(图37-28)。在从变



视紫红质 I 到变视紫红质 II 的转变中,希夫碱键发生去质子化,这约需 1 毫秒。变视紫红质 II 中的未质子化的希夫碱在约 1 分钟中被水解,产生视蛋白和全反视黄醛,后者扩散离开蛋白质,因为它不能适应为 11-顺式异构体的准备结合部位。在暗中,全反视黄醛异构化形成 11-顺视黄醛,后者与视蛋白联合重新形成视紫红质。与视紫红质光解的前几步反应相反,希夫碱的水解太慢了以致不与神经冲动的触发相干。

图37-28 视紫红质光解的中间体。指出了每种物质的最大吸收波长和每个转变的时间常数。

## 光使外段的质膜超极化

视黄醛的顺-反异构化和随之发生的视紫红质的构象变化是视兴奋中最初的事件。通过对完整视网膜的电生理研究已经阐明了触发神经冲动中后面的一个重要步骤。在一个光脉冲作用后,外段的质膜变为暂时地超极化(图37-29)。超极化的动力学取决于光脉冲的强度和稳定的背景照明度的水平。对一个单个光子的反应在约 1 秒钟内发生,而一个强脉冲在几微秒内就能引起质膜超极化。视杆细胞没有动作电势。它对于光的反应是分步渐进的。从外段送到突触的信号取决于吸收的光子数量。一个含  $40 \times 10^6$  个视紫红质分子的外段仅仅吸收 30 个光子,就能使充分敏感的暗适应视杆细胞的超极化达到半最大值(图37-30)。一个暗适应视杆细胞在吸收一个光子时能引起约 1 mV 的超极化,这个超极化能被突触感受,并传送到视网膜的其他神经元。优异的敏感性并不是视杆细胞唯一值得注意的性质。另一个显著的特征是:这个光检测器对光脉冲的反应取决于背景光水平。激发一个经常在亮处的视杆细胞比激发暗中的视杆细胞需要多得多的光子(图37-30)。这个性质叫做适应,它使视杆细胞能在背景光强度有几个数量级差别下觉察出反差。

这个光诱导的超极化的离子基础是什么呢?视杆细胞外段的质膜在黑暗中对  $\text{Na}^+$  是高度

可通透的。由于 $\text{Na}^+$ 浓度有一个大的跨越质膜的梯度，在黑暗中钠离子迅速流进外段。这个梯度是由位于内段质膜里的 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ATP酶泵维持的。因此，在暗中钠离子流进外段，扩散到内段，然后又被ATP驱动的泵排出。光以某种方式阻断了外段质膜中的 $\text{Na}^+$ 通道。结果， $\text{Na}^+$ 向内的流动减少，以至膜的内表面变得更负。

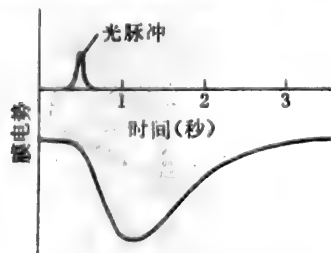


图 37-29 光使视网膜视杆细胞的质膜超极化。

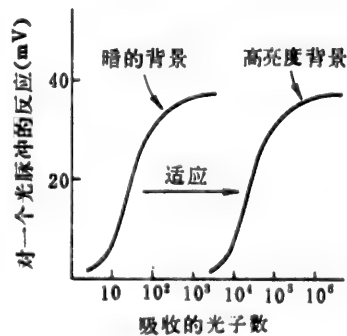


图 37-30 视网膜视杆细胞对光脉冲的敏感性取决于背景光水平。

换言之，经光照的视杆细胞的膜电势向着 $\text{K}^+$ 平衡电势移动。然后，处于光照的圆盘附近的光诱导的超极化由质膜被动地传送到突触体。

### 传递介质将信号从光解的视紫红质传送到质膜

质膜对 $\text{Na}^+$ 的通透性的变化和随之发生的超极化是外段的高倍放大的反应。暗适应视杆细胞只要吸收单独一个光子就能阻断多于一百万个钠离子的流动。这个惊人的放大的机制是什么呢？要注意的第一点是，含有大部分视紫红质分子的圆盘膜与视杆细胞的质膜不相连。并且这些膜也不是电偶联的。此外，吸收光子的视紫红质分子可能距离质膜中的钠通道有几千埃，因此这些部位之间的直接的相互作用明显地是不可能的。诚然，信号几乎肯定是被可扩散性传递介质从圆盘膜中光解的视紫红质运送到质膜的。实际上，单个光解的视紫红质的作用一定能使大量的传递介质形成（或破坏），才能解释观察到的高度的放大。

传递介质是什么？仍然是个神秘问题，但搜寻对象正在向两个有吸引力的候选者集中：钙离子（图37-31）和环GMP（图37-32）。能说明 $\text{Ca}^{2+}$ 是传递介质的实验发现是：

1. 当胞液中的 $\text{Ca}^{2+}$ 水平提高时，质膜中的钠通道关闭，而当 $\text{Ca}^{2+}$ 水平降低时，钠通道打开。

2. 当专门结合 $\text{Ca}^{2+}$ 的螯合剂被引入胞液时，视杆细胞对光的敏感性降低。这个减感作用暗示：光解单个视紫红质会导致释放几百个 $\text{Ca}^{2+}$ 进入胞液。

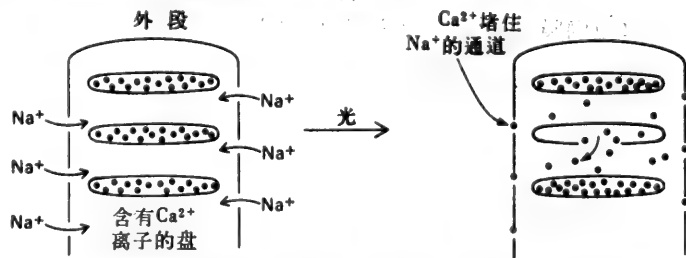


图 37-31 解释视兴奋中钙离子是传递介质的假说的示意图。

3. 在光脉冲作用后，从照亮的视杆细胞的外段有许多 $\text{Ca}^{2+}$ 被排出。

其他的实验表明：环GMP可能是一个传递介质。一些关键性的观察结果是：

1. 当胞液中环GMP的水平提高时，质膜中的钠通道开放，而当这个核苷酸的水平降低

时，钠通道关闭。

2. 环GMP的水平受光的调节。明确地说，光激活水解环GMP的磷酸二酯酶，这些即将要描述到。

3. 光解单个视紫红质分子导致多于 $10^5$ 个环GMP分子的迅速水解。

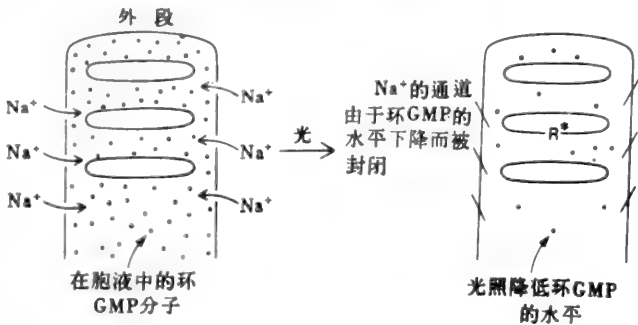


图37-32 解释视兴奋中环GMP是传递介质的假说的示意图。

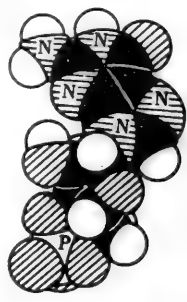
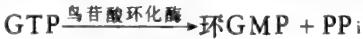


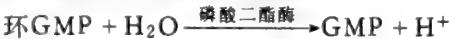
图37-33 环GMP的分子模型。

### 光激活磷酸二酯酶从而降低环GMP的水平

这些实验的发现说明， $Ca^{2+}$ 和环GMP深深地影响着视杆细胞的兴奋性。在视兴奋中这些物质的相互作用可能是重要的。关于光引起 $Ca^{2+}$ 释放进入胞液的分子机制了解得很少。然而，最近在确定光如何控制视杆细胞外段的环GMP的水平方面已经取得了很大的进展。鸟苷酸环化酶是催化环GMP合成的酶，但光对它的影响似乎不明显。



相反，光以惊人的方式控制水解环GMP的磷酸二酯酶。



在光照时，这个磷酸二酯酶的活力增加几百倍。光解的视紫红质对这酶的刺激由一个称作转导蛋白的调节蛋白质所介导。在暗中，转导蛋白含有一个紧密结合的GDP分子。在光照

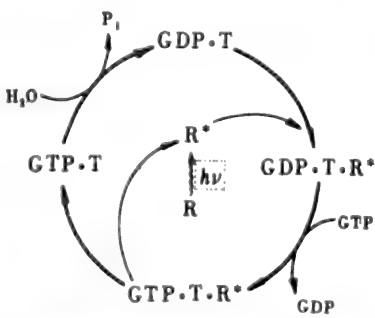


图37-34 光解视紫红质催化转导蛋白 GTP复合物的形成。这个复合物又激活环GMP磷酸二酯酶。[依据B.K.K. Fung and L. Stryer, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77 (1980) 2503.]

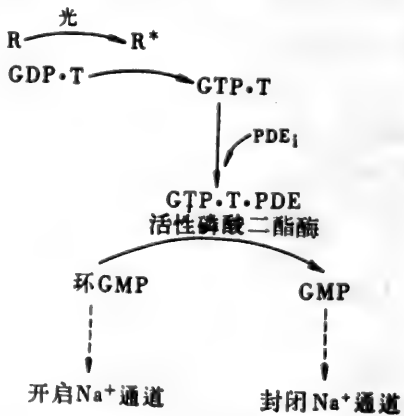


图37-35 假设的视觉中环核苷酸级联反应。所用缩写是：R，视紫红质；R\*，光解的视紫红质；T，转导蛋白；PDE<sub>i</sub>，无活性磷酸二酯酶；PDE，活性磷酸二酯酶。

时，光解的视紫红质与GDP-转导蛋白形成复合物，并且催化以GTP置换GDP的反应（图37-34）。得到的GTP-转导蛋白复合物激活磷酸二酯酶。重要的一点是：单独一个光解视紫红质能够催化几百个转导蛋白分子上以GTP置换GDP的反应，这几百个分子转导蛋白依次又激活几百个磷酸二酯酶分子。每个磷酸二酯酶的转换数约为 $10^3 \text{秒}^{-1}$ ，所以每秒钟每个光解视紫红质能水解大于 $10^5$ 个环GMP。这个系统能通过其内部设置的GTP酶恢复到暗时的状态。与转导蛋白结合的GTP缓慢地水解生成GDP-转导蛋白，后者就不再激活磷酸二酯酶。因此，推动这个放大循环的自由能来自GTP的水解。在此我们看到利用 $\sim P$ （高能磷酸键）来放大信号。这个环核苷酸在视觉中的级联反应（图37-35）使人联想起环核苷酸在传递 $\beta$ -肾上腺素能激素（例如肾上腺素）中的作用（656页）。

### 色视觉由三种光受器介导

1802年，杨，T. (Thomas Young) 提出，负责色觉的是三个基本的感受器。一个半多世纪以后，用完整视网膜所做的分光光度学研究揭示，事实上有三类视锥细胞，它们是：蓝吸收，绿吸收和红吸收细胞。用直径 $1 \mu\text{m}$ 的光束照亮视锥细胞，得到了这三个光受器色素的吸收光谱（图37-36）。而且，已经将微电极插进了许多视锥细胞。其质膜的超极化作用的光谱分成三组，其峰值分别在可见光谱的蓝、绿和红色区域。在金鱼中，这

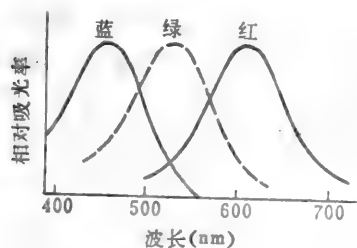


图37-36 三个色感受器的吸收光谱。

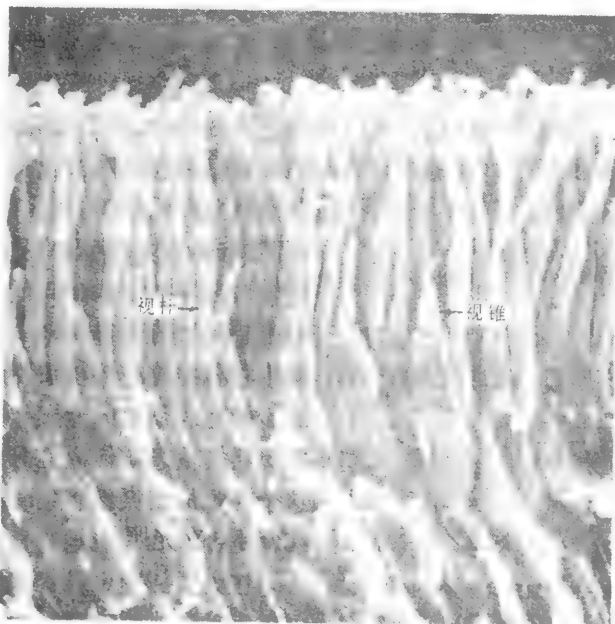


图37-37 视网膜光受器层的视杆细胞和视锥细胞的扫描电子显微镜照片。〔蒙Dr. William Miller特许。〕

三个色感受器的吸收峰在455, 530和625nm，而视紫红质的最大吸收峰在500nm。

所有三种视锥细胞中的生色团都是11-顺视黄醛。在没有蛋白质时，11-顺视黄醛质子化的希夫碱的最大吸收在380nm。因此，视蛋白上的基团对结合的11-顺视黄醛的生色性质有很大影响。这个生色团的吸收性质对于它的蛋白质环境的依赖性的事实，可作为一个一般原则的实例，即：辅基的性质是通过辅基与蛋白质的相互作用来调节的。另一个例子是，血红素基团在血红蛋白中是起氧载体的作用，在细胞色素c中起电子载体的作用，而在过氧化物酶中起催化剂的作用。

多种形式的色盲皆是由伴性隐性突变所引起的。约1%的男人是红色盲，2%是绿色盲。



用完整眼睛所做的光谱测量指出,这些人不是缺少红吸收就是缺少绿吸收的光感受分子,或者他们的色素改变了,其吸收光谱有了转移。因此,色盲是由一种视锥细胞视蛋白的缺乏或缺陷而引起的。

### 所有已知视觉系统中的生色团都是11-顺视黄醛

能分辨图象的眼睛仅在软体动物,节肢动物和脊椎动物这三类中发现。这三类的眼睛在解剖学上相当不同,因而被认为是独立地进化而来。然而,三种眼睛都用11-顺视黄醛作为它们光感受分子中的生色团。这是趋同进化的一个明显的例子。11-顺视黄醛有什么特殊之处呢?首先,它具有能很快地移入可见光谱区的强吸收带。第二,光能高效地使11-顺视黄醛异构化;而在暗中它异构化的速率非常低。第三,由异构化引起的结构变化很大。光被转变成足够大的原子运动以触发神经冲动的产生。最后,11-顺视黄醛的最初前体是胡萝卜素(369页),它在生物中分布非常广泛。

### 细菌的化学感受器探测特定的分子并将信号送至鞭毛

十九世纪后期,德国植物学家费弗尔,W.(Wilhelm Pfeffer)指出:运动的细菌聚集在含有吸引剂(如糖类)的细毛细管口附近(图37-38)。相反,如果毛细管含有拒斥剂,那么



图37-38 细菌对含有吸引剂(例如葡萄糖)的毛细管的趋化性。

细菌就离开毛细管,拒斥剂通常是有害的物质或是细菌的排泄物。细菌趋向一些特定的物质和离开另一些物质的有向性运动叫做趋化性。在本世纪六十年代,艾德勒,J.(Julius Adler)开始研究细菌趋化性的分子基础。由他和许多其他研究者进行的生物化学、遗传学和结构的分析获得了有关这个过程的许多发现。趋化性开始于细胞表面上的专属化学感受器对化学药品的探测。来自这些感受器的信息被传递到分析和整合许多刺激的加工系统。然后,这个感觉加工系统将信号送到推动鞭毛的运动肌。这些信号确定细菌是否继续平稳地沿直线游动,还是突然改变它的路线。

在大肠杆菌中已经识别了约20种不同的化学感受器。这些蛋白质每种皆或位于质膜中,或位于周质空间中。化学感受器有一个识别成分和一个发信号的成分。正趋化性(吸引)的识别成分实际就是运送那个物质进入细胞的结合蛋白。例如,结合半乳糖的蛋白质是周质空间中的一个溶解性蛋白质,它除了是主动运输半乳糖进入细胞的泵的一部分外,还是对半乳糖有正趋化性的识别蛋白。葡萄糖的化学感受器是结合于膜上主动吸收这个糖的磷酸转移酶系统的一个成分(679页)。大肠杆菌的表面也含有吸引剂(如丝氨酸、半胱氨酸、丙氨酸和甘氨酸)的化学感受器。运输和趋化性是紧密相关的,但是趋化性不需要运输。一些在运输某一个特定的糖或氨基酸方面有缺陷的突变种仍保持着向糖或氨基酸移动的能力。也存在着各种负趋化性的化学感受器。脂肪酸、醇、疏水氨基酸、吡啶、 $H^+$  ( $pH < 6.5$ )、 $OH^-$  ( $pH > 7.5$ )和硫化物通过与专属的化学感受器相互作用而排斥细菌。



## 鞭毛底部的可逆运动肌使细菌的鞭毛转动

细菌通过转动它们表面的鞭毛而游动。这些螺旋形的细丝状体由53kdal的鞭毛蛋白亚基组成。大肠杆菌约有六根鞭毛，这些鞭毛的直径是150Å，长是10μm。细菌的鞭毛比真核生物的鞭毛和纤毛小得多，并且更加简单（649页）。细菌的鞭毛不能灵活地弯曲，因为它缺少可收缩的装置。它的转动依赖于位于丝状体和细胞被膜接点处的运动肌。已分离得到仍带有基部结构的鞭毛，这有助于了解这些装置，它们是由丝状体、钩状体和杆状体组成。在大肠杆菌中，杆状体上安装着四个环。外环结合于外膜上，而内环结合于细胞被膜的质膜上。基体（图37-40）把鞭毛固定在细胞被膜上，并主动地推动它的旋转。赋予这个运动肌动力的是跨质膜的质子移动力，而不是水解ATP。事实上，转动的角速度与质子移动力成正比。这个运动肌的一个诱人的特点是，它能顺时针或反时针转动。

一个大肠杆菌典型的运动是沿一条近似直线平稳地游动约1秒钟。在这段时间中它行进大约30μm距离，这约等于其15个躯体长。然后，细菌通过滚转突然改变它的路线（图37-41）。平均的方向变化约为60度。由什么来决定细菌是平稳地游动还是滚转呢？当鞭毛反时针转动时，螺旋形的丝状体形成紧凑的束，因此细胞平稳地游动。相反，当鞭毛突然顺时针转动时，毛束就飞散开来。然后，每一根鞭毛向不同方向划动造成了细胞的滚转。

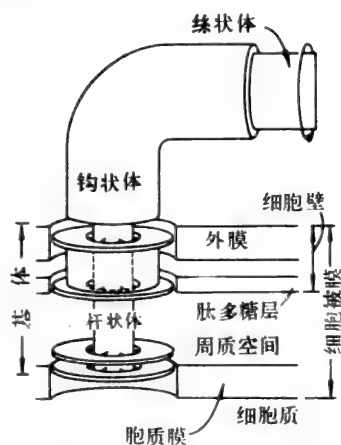


图37-40 大肠杆菌鞭毛的基体。[依据J. Adler, The sensing of chemicals by bacteria, Copyright © 1976 by Scientific American, Inc.]

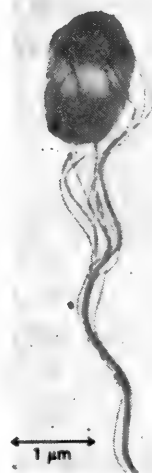


图37-39 鼠伤寒沙门氏菌的电子显微照片，示鞭毛成束状。[蒙Dr. Daniel Koshland, Jr. 特许。]



图37-41 用能自动在三个方向跟踪细菌运动的显微镜得到的大肠杆菌行踪的投影图。黑点间距80毫秒。[引自H. C. Berg, Nature 254 (1975): 390.]

## 细菌察觉瞬时而不是瞬息空间的梯度

滚转频率的调节是趋化性的中心问题。当细菌向着吸引剂浓度增加的方向移动时，其滚转频率减低。相反，当它离开吸引剂移动时，滚转变得频繁一些。拒斥剂对于滚转频率有相反的作用。因此，细菌向着吸引剂或离开拒斥剂移动比它们向相反方向移动时能平稳地游动一段较长的时间。滚转的作用是调整细菌错误的方向。

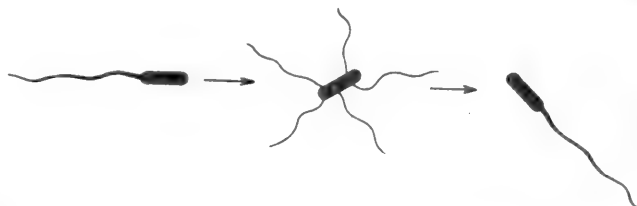


图37-42 鞭毛运动肌的突然逆转使鞭毛束分散开来，从而引起滚转。[依据 Dr. Daniel Koshland, Jr. 热情提供的图。]

一个细菌是对其一端吸引剂的浓度与另一端的浓度加以比较呢？还是将吸引剂现在的浓度与不久之前的浓度加以比较？换言之，感觉的机制是空间的还是时间的？小科什兰德，D.

(Daniel Koshland, Jr.) 和麦克纳布，R. (Robert Macnab) 进行了一个巧妙而简单的实验回答了这个问题。他们将不含吸引剂的细菌悬液与含吸引剂的溶液迅速混合，并观察细菌的滚转频率。惊人的发现是，在混合后一秒钟内滚转被抑止了。细菌在这个迅速混合的没有空间梯度的溶液中沿直线作长距离游动。因此，这个实验说明：细菌具有时间的感觉机制。换句话说，细菌察觉吸引剂的空间梯度不是比较处于它的头部和尾部的浓度，而是在穿过空间的行进中比较这段时间里它的观察结果。实质上，细菌的趋化性是有偏的随机移动。细菌的有目的的行为来自其对随机运动的选择。

## 在细菌的趋化性中信息通过甲基化的蛋白质流动

细菌对于吸引剂的特定的浓度梯度的反应不是固定的。由吸引剂浓度的提高引起的滚转的抑止是短暂的。在一个滞后期后，滚转的速度回到未刺激的水平。从效应来看，细菌已经变得对继续存在的吸引剂不敏感了。这个脱敏作用叫做适应，它使细菌能察觉广泛范围内的吸引剂浓度梯度。如前已提到的，视网膜视杆细胞对光的反应与此类似（图37-30）。

细菌趋化性的遗传学分析揭示出：信息由至少12个化学感受器汇集进入三个蛋白质，这些蛋白质是 *tsr*, *tar* 和 *trg* 基因的产物（图37-43）。例如，来自核糖和半乳糖感受器的信号集中于 *trg* 蛋白质。这三个蛋白质的甲基化是可逆的，所以它们被称为接受甲基的趋化性蛋白质 (MCPs)。每一个蛋白质上都有几个谷氨酸侧链被转甲基酶甲基化，后者以 S-腺苷甲硫氨酸作为活性供体。这些共价修饰可被特定的酯酶逆转。吸引剂提高 MCPs 甲基化的程度，而拒斥剂降低这个程度。事实上，适应可能就是由这些蛋白质甲基化的程度来介导的。

然后，来自三个接受甲基的蛋白质的信息集中于 *che* 基因的产物。现在还不知道这些分

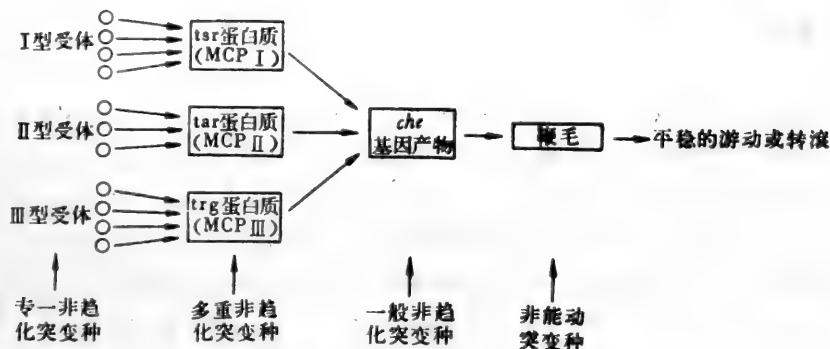


图37-43 细菌趋化性中的信息流。图的下部注出已获得分离的突变种的类型。MCP 指接受甲基的趋化性蛋白质 [依据R. S. Springer, M. F. Coy, and J. Adler, *Nature* 280 (1979): 280.]

子是如何决定鞭毛旋转的方向的。然而，以下的事实是清楚的，即：细菌具有由大约三十个基因的产物组成的原始感觉系统，这个感觉系统对其周围环境中有关营养物和毒物的信息进行处理和综合。对于细菌来说，问题的精髓是是否滚转！

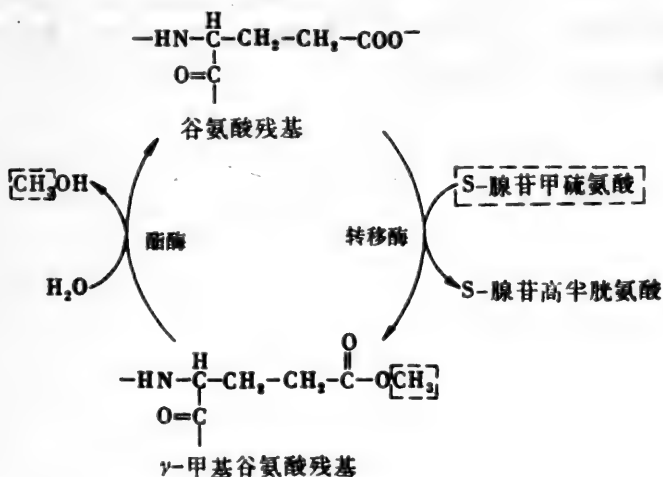


图37-44 接受甲基的趋化性蛋白质的可逆甲基化作用。

## 概 要

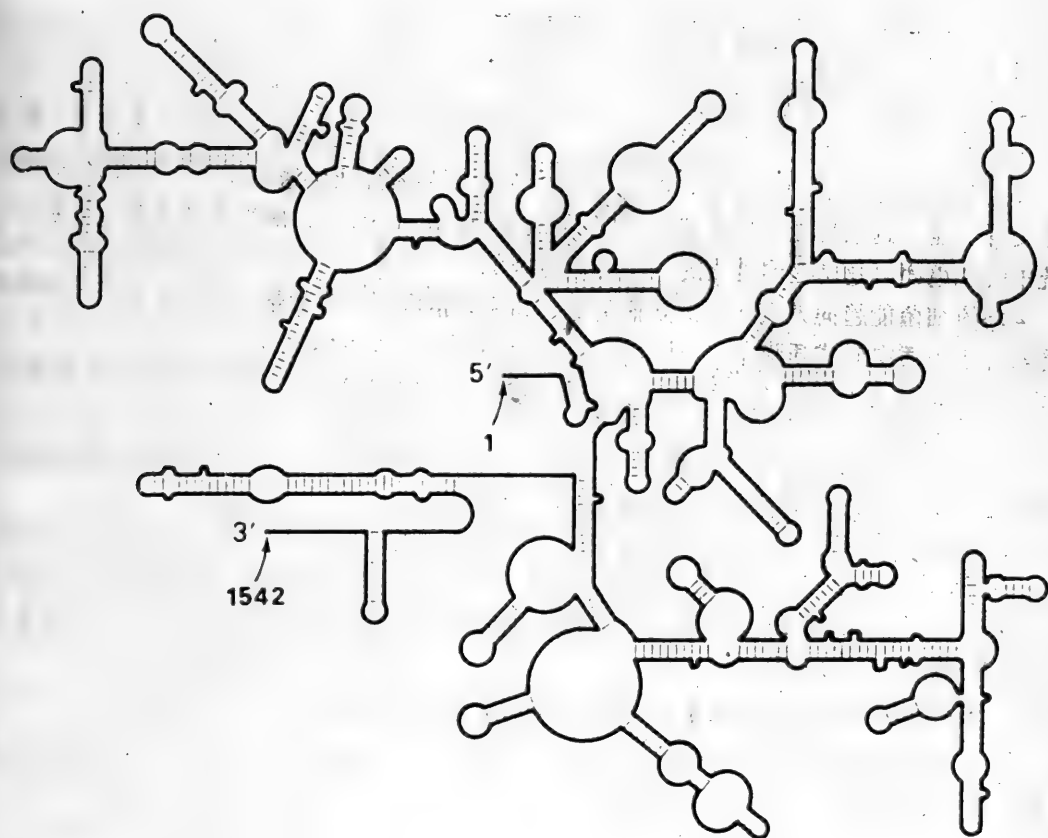
神经轴突膜中的动作电势由 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 通透性的暂时性变化介导。 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 通道两者都由跨膜电压来调节。河豚毒素和蛤蚌毒素专属地堵塞 $\text{Na}^+$ 通道。化学传递介质执行神经冲动穿过多数突触的传送。乙酰胆碱是许多突触和运动终板处的神经传递介质，它由乙酰辅酶A和胆碱合成。乙酰胆碱分子包装在突触泡中，当一个神经冲动来到时突触泡与突触前膜融合。释放的乙酰胆碱扩散跨过突触间隙，并与突触后膜上的专属蛋白质受体结合。随之发生的 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 通透性的提高导致这个膜的去极化。乙酰胆碱受体对 $\alpha$ -金环蛇毒素和其他的神经毒素有高亲和力，这个特性有助于这个膜本体蛋白的纯化。乙酰胆碱酯酶水解乙酰胆碱后突触后膜

重极化。乙酰胆碱酯酶受到有机磷酸盐,例如DIPF的抑制,DIPF由于引起呼吸麻痹而具致死性。儿茶酚胺(肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺)和 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)也是神经传递介质。

视网膜视杆细胞能被一个单个光子所激发。视杆细胞的外段含有约1000个重叠堆积起来的圆盘(视盘),这些圆盘是封闭的双层膜,膜内密集地挤满着跨膜蛋白质视紫红质分子。视紫红质(即光感受蛋白质)的生色团是11-顺视黄醛,它从全反视黄醇(维生素A)衍生而来。11-顺视黄醛与视蛋白的一个特定的赖氨酸残基形成希夫碱键。视兴奋中最初的事件是11-顺视黄醛基团异构化成全反视黄醛。视兴奋中较后的一步是外段质膜的超极化,这是由于它对 $\text{Na}^+$ 的通透性降低而引起的。暗适应视杆细胞吸收单独一个光子就能阻断一百多万钠离子的流动。传递介质(可能是 $\text{Ca}^{2+}$ 或环GMP)将信号从光解视紫红质传送到质膜。色视觉由三种光感受器传递,这三种光感受器都含有11-顺视黄醛。事实上,11-顺视黄醛是所有已知视觉系统中的生色团,这是趋同进化的一个明显的例子。

运动的细菌能趋向吸引剂(例如葡萄糖)和离开拒斥剂(例如脂肪酸)运动。趋化性的感受器位于周质空间或质膜中。运动肌驱使细菌鞭毛旋转,它的动力来自质子跨质膜的流动。细菌能平稳地游动约1秒钟,然后当它们鞭毛旋转的方向突然从反时针变到顺时针时,就出现滚转。当细菌趋向吸引剂或离开拒斥剂运动时,滚转被抑止。细菌察觉瞬时而不是瞬息空间的梯度。信息从化学感受器流向三个接受甲基的趋化性蛋白质(MCPs),然后流到鞭毛。MCPs的可逆甲基化作用控制察觉系统的敏感性。

## 第六篇 第三版新增内容



核糖体 RNA 分子的折叠型式

# 译者说明

(吴相钰 译)

正当本书第二版的全部译稿及插图均已排版、校对完毕，即将付印出版时，我们得到新出的第三版。与第二版相比，第三版作了许多增、删、改、易。全书篇幅由 835 页增至 1114 页，章数由 36 增至 39。有的章节被删去，但增加的更多；有的章节名称未变，却增加了新内容；有的部分完全改写。不少地方次序颠倒，主要是将一部分与分子生物学关系密切的内容提前。新增的插图有数百幅之多，有许多更换了新图。

为使本书第三版的译本早日问世，同时又不至增加读者过多的负担，我们决定第二版已排好的内容不变，另外增加一个第六篇，名为“第三版新增内容”。这一篇包括所有新增和新改的内容和一部分新的插图。

为了便于读者对照阅读前五篇（第二版的内容）和第六篇（第三版的内容），现将第二、三两版的内容按篇、章比较于下，并作如下说明：

1. 第六篇中各章的顺序及标题均从第三版，每章有新增的节以及标题未变但内容有增加或修改者，均先列出节的标题并将新增部分一一译出。

2. 为减轻读者负担，新增的插图中只选择了一部分制版，而且一律改为黑白图。新增图、表的编号均为 III-XX-XX，“III”表示第三版，XX-XX 则为第三版中图表的编号。例如第 4 章中的第 15 图，则编号为 III-4-15。有些与反应机理有关的插图则改成反应式形式放在译文之内。

3. 第三版各章中均列有许多 1980 年以后的文献，一并列在本篇之后。

4. 在第三版各章中有不少新增的习题，为节省篇幅，未予译出。又，本篇新增的内容也未编入书后索引之内。敬希读者鉴谅。

第 三 版	第 二 版
<b>第一篇 生命的分子设计</b>	<b>第一篇 构象和动力学（部分）</b>
<b>第 1 章 前奏</b>	<b>第四篇 信息（部分）</b>
<b>第 2 章 蛋白质结构和功能</b>	<b>第 1 章 分子和生命</b>
<b>第 3 章 蛋白质研究技术</b>	<b>第 2 章 蛋白质的结构和功能导论</b>
<b>第 4 章 DNA 和 RNA；遗传的分子</b>	<b>第 2 章</b>
	<b>第 24 章 DNA：遗传作用、结构和复制（部分）</b>
	<b>第 25 章 信使 RNA 与转录（部分）</b>
<b>第 5 章 遗传信息流</b>	<b>第 26 章 遗传密码和基因-蛋白质间的关系（部分）</b>
<b>第 6 章 基因研究技术</b>	<b>第 24 章，第 25 章</b>

第 三 版	第 二 版
<b>第二篇 蛋白质的动力学、构象和功能</b>	<b>第一篇 构象和动力学 (部分)</b>
第 7 章 传递氧的蛋白质:肌红蛋白和血红蛋白	第 3 章 氧的传递者:肌红蛋白和血红蛋白
第 8 章 酶引论	第 4 章 血红蛋白:变构蛋白
第 9 章 酶作用的机理	第 5 章 分子病:镰刀型细胞贫血症
第 10 章 酶活性的控制	第 6 章 酶引论
第 11 章 结缔组织蛋白	第 7 章 酶作用的机理
第 12 章 生物膜引论	第 8 章 酶原的活化:消化酶和凝血因子
<b>第三篇 代谢能的产生和贮藏</b>	第 9 章 结缔组织蛋白:胶原、弹性蛋白和蛋白聚糖
第 13 章 代谢作用:基本概念和设计	第 10 章 生物膜引论
第 14 章 碳水化合物	<b>第二篇 代谢能的产生和贮藏</b>
第 15 章 糖酵解	第 11 章 代谢作用:基本概念和设计
第 16 章 柠檬酸循环	第 12 章 糖酵解 (部分) 及本章附录
第 17 章 氧化磷酸化	第 32 章 细菌细胞的外壁 (部分)
第 18 章 戊糖磷酸途径与葡萄糖异生作用	第 12 章 糖酵解
第 19 章 糖原代谢	第 13 章 柠檬酸循环
第 20 章 脂肪酸代谢	第 14 章 氧化磷酸化
第 21 章 氨基酸降解和脲循环	第 15 章 戊糖磷酸途径与葡萄糖异生作用
第 22 章 光合作用	第 16 章 糖原和双糖代谢
<b>第四篇 大分子前体的生物合成</b>	第 17 章 脂肪酸代谢
第 23 章 膜脂和固醇激素的生物合成	第 18 章 氨基酸降解和脲循环
第 24 章 氨基酸和血红素的生物合成	第 19 章 光合作用
第 25 章 核苷酸的生物合成	<b>第三篇 大分子前体的生物合成</b>
第 26 章 代谢作用的整合	第 20 章 膜脂和固醇激素的生物合成
<b>第五篇 遗传信息:贮藏、传递和表达</b>	第 21 章 氨基酸和血红素的生物合成
第 27 章 DNA 的结构、复制和修复	第 22 章 核苷酸的生物合成
第 28 章 基因重排:重组和易位	第 23 章 代谢作用的整合
第 29 章 RNA 的合成和剪接	<b>第四篇 信息:遗传信息的贮藏、传递和表达</b>
第 30 章 蛋白质合成	第 24 章 DNA:遗传作用、结构和复制
	第 31 章 基因重排:重组、易位和克隆
	第 25 章 信使 RNA 和转录
	第 27 章 蛋白质合成

第 三 版	第 二 版
<p>第 31 章 蛋白质到位</p> <p>第 32 章 原核生物中基因表达的控制</p> <p>第 33 章 真核生物的染色体和基因表达</p> <p>第 34 章 病毒和致癌基因</p> <p><b>第六篇 分子生理学：生理过程中信息、 构象和代谢的相互作用</b></p> <p>第 35 章 分子免疫学</p> <p>第 36 章 肌肉的收缩和细胞的运动</p> <p>第 37 章 膜转运</p> <p>第 38 章 激素的作用</p> <p>第 39 章 可兴奋膜和感觉系统</p>	<p>第 27 章</p> <p>第 28 章 基因表达的调控</p> <p>第 29 章 真核生物染色体和基因表达</p> <p>第 30 章 病毒</p> <p><b>第五篇 分子生理学：生理过程中信息、 构象和代谢的相互作用</b></p> <p>第 33 章 免疫球蛋白</p> <p>第 34 章 肌肉收缩和细胞游动性</p> <p>第 36 章 膜运输</p> <p>第 35 章 激素作用</p> <p>第 37 章 可兴奋膜和感觉系统</p>



# 第1章 前 奏

## 本书的设计

本书共分六部分，每部分的主题是：

- I. 生命的分子设计
- II. 蛋白质的构象、动态和功能
- III. 代谢能的产生和贮藏
- IV. 大分子前体的生物合成
- V. 遗传信息
- VI. 分子生理学

第 I 部分是综览生命的核心分子——DNA, RNA 和蛋白质以及它们的相互作用。我们从蛋白质开始，其独特之处是能够识别许许多多极其不同的分子并与它们结合。由于蛋白质催化几乎所有必需的化学反应，所以它决定着生物体系中化学转变的格局。然后我们讨论 DNA，这是所有细胞中遗传信息的仓库。DNA 双螺旋的发现立即导致了对 DNA 如何复制的了解。下一章则讨论遗传信息从 DNA 流向 RNA 再流向蛋白质。第一步称为转录，是 RNA 的合成；第二步称为翻译，是根据信使 RNA 的模板所给出的指令而进行的蛋白质的合成。遗传密码把 DNA 和 RNA 中 4 种碱基的顺序与蛋白质中 20 种氨基酸的顺序之间的关系特定化，其简单程度真是美妙之极。3 个碱基组成一个密码子，这就特定化一种氨基酸的单位。翻译是在一种称为核糖体的有组织的组装体中进行的，是由 100 种以上的蛋白质和 RNA 分子之间相互协调的相互作用而完成的。部分 I 中还列有研究蛋白质和基因的实验方法。此外还介绍了重组 DNA 的技术，并列举了在分析和改变基因和蛋白质方面这种技术的威力和普遍性的例子。

蛋白质所代表的三维结构与生物学活性之间的相互作用是第 II 部分的主题。肌红蛋白和血红蛋白是脊椎动物体内携带氧的蛋白质，详细介绍了它们的结构与功能，因为这两种蛋白质说明了许多一般原理。血红蛋白特别有意义，因为它与氧的结合为其环境中一些特殊分子所调节。还介绍了血红蛋白的分子病理学，特别是镰刀型红细胞贫血病。然后我们讨论酶，并研究它们如何识别底物、并使反应速率增加上百万倍甚至更多。详细讨论了溶菌酶、羧肽酶 A 和胰凝乳蛋白酶这几种酶，因为它们的研究曾阐明了催化作用的许多一般原理。随后讨论了专门的起控制作用的蛋白质和其他信号分子对酶活力的调节。在关于胶原和弹性蛋白这两种结缔组织蛋白质的一章中，出现了构象这一主题的相当不同的侧面。第 II 部分的最后一章是介绍生物膜，这是脂质和蛋白质的有组织的装配。膜的作用是创造分隔的区域并控制它们之间的物质流和信息流。

第 III 部分讨论代谢能的产生和贮存。首先介绍了代谢作用的总的策略。细胞把燃料分子中的能量转变为 ATP，而 ATP 则推动细胞中大多数需能过程。此外，还产生 NADPH 形式的还原能力以供生物合成之用。然后详细介绍了进行这些反应的代谢过程。例如，由葡萄糖产

生 ATP 就需要相继发生的三个系列的反应——糖酵解，柠檬酸循环和氧化磷酸化。后两个系列也是脂肪和某些氨基酸氧化产生 ATP 所共有的反应，脂肪和氨基酸是另外两种主要的燃料。这里我们看到了分子经济学的例证。部分Ⅲ中还讨论了燃料分子的两种贮藏形式，即糖元和三酰基甘油（中性脂肪）。本书这一部分的最后一章是光合作用。光合作用的原初反应是光所活化的电子逆化学势梯度而从一种物质传递至另一种物质。正如在氧化磷酸化作用中一样，电子流导致质子的跨膜泵动，而它又推动 ATP 的合成。实质上，生命的能源是质子电池，而质子电池最终又是由太阳所能化了的。

第Ⅳ部分讨论大分子前体的生物合成，由膜脂质和固醇类开始。胆固醇是一种 27 个碳的固醇，其合成途径有着特殊的意义，因为其中的所有碳原子都来源于一个 2-碳的前体。然后讨论导致一些氨基酸和血红素基团的合成的反应。这些途径中的控制机理有着普遍的意义。然后讨论核苷酸的合成，这是 DNA 和 RNA 的活化的前体。本部分的最后一章讨论代谢的整合。产生能量的反应和消耗能量的反应是如何相互协调以满足生物体的需要的？

遗传信息的传递和表达是部分Ⅴ的主题。在部分Ⅰ中已介绍了 DNA 在遗传上的作用和结构以及遗传信息流。我们现在继续讨论这一主题，内容更加丰富，包括了蛋白质和代谢性转变。首先讨论 DNA 复制和 DNA 修复的机理。DNA 复制中最有趣的一个方面就是其极高度的准确性。然后介绍基因重组和易位的过程，这些过程产生 DNA 的新的组合。随后我们讨论转录和新生的转录本的加工以形成起作用的 RNA 分子。再后便是蛋白质合成的机理，各种 tRNA，各种 mRNA 和核糖体均在此过程中相互作用。我们然后讨论蛋白质是如何被送到各种不同的专门目的地的。下一章研究细菌中基因表达的控制。本章的集中点是大肠杆菌的乳糖操纵子和色氨酸操纵子，这是目前已详细了解的。这章之后便是高等生物体内基因表达的调节——目前正在鉴定出控制多细胞有机体发育的分子。下一步是讨论病毒的繁殖和组装。病毒的组装是生物大分子如何从少数几种建造元件形成高度有序结构的一般原理的体现。由于揭示了致癌基因的存在，病毒也有助于深入了解癌症的分子基础。致癌基因是基因的一种变型，它控制细胞的生长。

部分Ⅵ题为“分子生理学”，是从生物化学向生理学的过渡。在本书前面所阐述的概念在这里都有用，因为生理学涉及遗传信息、构象和代谢的相互作用。我们从免疫反应开始。有机体如何鉴别外来物质？下一章讨论化学键中的能量如何转变成协调的运动——肌球蛋白和肌动蛋白，这是肌肉中的主要蛋白，在高等生物的大多数细胞中都执行着收缩机能。然后讨论离子，如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$ ，以及分子的转运。膜中的分子泵控制着这些离子的转运以产生梯度，而离子的梯度则是兴奋性的核心问题。然后我们转而讨论激素和生长因子的作用基础。已发现许多类受体和信号偶联蛋白，信号转换中重复的特点也越来越明显了。最后一章讨论感觉过程并考虑这样一些问题，例如：细菌如何鉴别其环境中的养分并向它运动？动作电位如何在神经细胞中传播并越过轴突而被传递？一个光子如何能引发视网膜中的杆细胞？

生物化学的一个最令人满意的特点就是它继续不断地丰富我们在所有各种组织水平上对于生物学过程的了解。

## 第2章 蛋白质结构和功能

### 蛋白质结构的不同水平

(上略)近年来关于蛋白质构象、功能和进化的研究揭示了另外两种组织水平的重要性。**超二级结构** (super-secondary structure) 代表一群二级结构。例如,在许多种蛋白质中发现了被 $\alpha$ -螺旋隔开的两个 $\beta$ -链,这种特点称为 $\beta\alpha\beta$ 单位。把超二级结构看作是二级结构与三级结构之间的东西是有好处的。有些多肽链折叠成两个或更多个紧密的区域。这些区域之间可由一段形状易变的肽段所连接,就好像一串珍珠一样。这些紧密的球形的单位称为**结构域** (domain),其大小约为100至400个氨基酸残基。例如,一种抗体的25kd的L链即折叠成两个结构域。事实上,这两个结构域彼此相像,说明它们起源于一种原基因的复制。对高等真核生物的基因和蛋白质进行分析后,得出了一条重要的原理:**蛋白质结构域常常是由基因中称为外显子的特定部分所编码的**。在我们研究基因和蛋白质时,外显子和结构域常常是焦点。

### 根据氨基酸顺序预测构象

能够从氨基酸顺序推定蛋白质的构象吗?让我们从多肽主链的研究开始。回忆一下,主链能绕着坚固的肽单位向两边旋转。在主链的氮与 $\alpha$ -碳原子之间的键上旋转的量称为 $\phi$ ,而在 $\alpha$ -碳与羧基碳之间的键上旋转的量称为 $\psi$ 。当链中每一残基有其特定的 $\phi$ 和 $\psi$ 时,主链的构象就完全确定了。拉曼昌德兰(G. N. Ramachandran)认识到在一条多肽链中一个残基不可能有任意的一对 $\phi$ 和 $\psi$ 的数值。由于空间位阻的关系,有些组合是不可能存在的。很容易预测可能的 $\phi$ 和 $\psi$ 的范围,而且利用所谓**拉曼昌德兰作图法**可以在空间等高线图中看到这种范围。多聚L-丙氨酸的这种图说明有彼此分开的三个可能的范围(图Ⅲ-2-49)。其中的一个范围中的数值产生反向平行的和平行的 $\beta$ -片和胶原的螺旋;另一个范围中则产生右手 $\alpha$ -螺旋;第三个范围则为左手 $\alpha$ -螺旋。虽然在空间上是可能的,但左手 $\alpha$ -螺旋并不存在,因为从热力学上看,它不如右手 $\alpha$ -螺旋有利。对于甘氨酸,这三个可能的区域大得多,而且还出现了第四个区域(图Ⅲ-2-49),因为一个氢原子所引起的空间位阻要比甲基所引起的小得多。甘氨酸能让多肽主链发生一些其它残基所不可能允许的旋转。反之,五员的脯氨酸环却阻碍了围绕着C-N键的旋转,这明显地限制了构象的可能范围。在13种已精确测定的蛋白质结构中,2500以上残基的实测值与预测的范围极为吻合。

关于蛋白质构象的另外的知识来源于下列发现,即氨基残基在 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -片和反向旋转中出现的频率不同(表Ⅲ-2-3)。谷氨酸、甲硫氨酸和亮氨酸残基有利于 $\alpha$ -螺旋的形成。缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸促进 $\beta$ -片的形成。另一方面,脯氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和丝氨酸则促进反向旋转。布劳特(E. Blout)、法斯曼(G. Fasman)和卡恰尔斯基(E. Katchalski)关于合成多肽的构象的研究,还有其三维结构已知的蛋白质的分析,都揭示了这

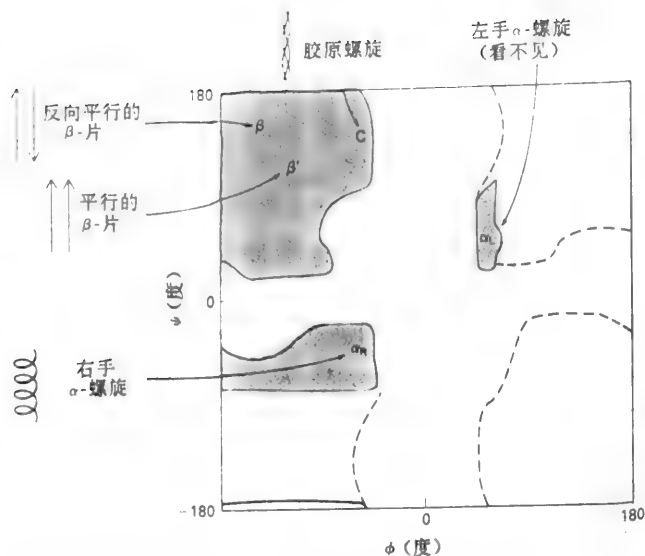


图 2-49 拉曼昌德兰作图，示出 L-丙氨酸残基的可能的  $\phi$  和  $\psi$  值（阴影部分）。甘氨酸可以有更多的构象（虚线中无阴影部分），因为它的侧链小。

表 2-3 在蛋白质二级结构中氨基酸残基出现的相对频率

氨基酸	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -片	$\beta$ -旋转
丙	1.29	0.90	0.78
半胱	1.11	0.74	0.80
亮	1.30	1.02	0.59
甲硫	1.47	0.97	0.39
谷	1.44	0.75	1.00
谷胺	1.27	0.80	0.97
组	1.22	1.08	0.69
赖	1.23	0.77	0.96
缬	0.91	1.49	0.47
异亮	0.97	1.45	0.51
苯丙	1.07	1.32	0.58
酪	0.72	1.25	1.05
色	0.99	1.14	0.75
苏	0.82	1.21	1.03
甘	0.56	0.92	1.64
丝	0.82	0.95	1.33
天冬	1.04	0.72	1.41
天胺	0.90	0.76	1.28
脯	0.52	0.64	1.91
精	0.96	0.99	0.88

来源：根据 T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman, 1983), p. 235.

种现象的一些原因。例如，在  $\beta$ -碳原子上有侧链（例如缬氨酸中）时就会由于空间位阻而使  $\alpha$ -螺旋不稳定。丝氨酸、天冬氨酸和天冬酰胺之所以趋向于破坏  $\alpha$ -螺旋，是因为它们的侧链中有与主键靠得很近的氢键的供体和受体，它们与主链争夺其 NH 和 CO 基团。

已经作了许多努力，以根据氨基酸顺序来预测其二级结构并获知各种残基在  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -片和反向旋转中出现的趋势。对于其结构已用 X 射线方法解决了的蛋白质而言，预测的二级结构与实际测得的二级结构相一致的部分约占蛋白质链的 60%。这些是鼓舞人心的开始，但显然还有许多工作要做。获得成功的可能努力方向的一条线索是下列发现：一个五肽可能是一种蛋白质中  $\alpha$ -螺旋的一部分，又可能是另一种蛋白质中  $\beta$ -片的一个区域。因此，局部的氨基酸顺序有时并不足以决定二级结构。一个肽段在其中折叠的环境可能是至关重要的。强有力的实验方法，如 X 射线结晶学、核磁共振波谱术和重组 DNA 克隆等正被配合应用，以解决这一基本问题。

## 蛋白质作用的实质：专一的结合和构象变化的传递

蛋白质作用的第一步是它与另一个分子结合。作为一类大分子的蛋白质，其特点是能够识别极其多种多样的分子并与之结合。例如肌红蛋白，当其多肽链有一部分折叠时，就能与一个血红素基团紧密结合。获得了血红素，就使得肌红蛋白能够执行其生物学功能，即可逆地与  $O_2$  结合。蛋白质也与其他蛋白质相结合，产生一个有高度组织的集体，例如肌肉中可收缩的纤维。外源分子与抗体蛋白的结合是免疫系统的核心，因此才能识别本身的和外来的东西。尤有进者，许多基因的表达是由蛋白质的结合所控制的，这些蛋白质能识别特定的 DNA 顺序。蛋白质类之所以能够专一地与如此多种多样的分子相互作用，是因为它们本领高超，能形成互补的表面和裂缝。这些表面上和这些裂缝中种类繁多的侧链使得蛋白质能与其他分子形成氢键、静电键和范德华键。其次，这些相互作用的强度及其存续时间又可被精确地控制。

如前所述，生物系统中几乎所有的反应都是由称为酶的蛋白质所催化的。我们现在能够认识为什么蛋白质在确定化学转化的型式中起着独一无二的作用。蛋白质的催化能力来自于它以准确的取向与底物分子结合，并且在形成和打断化学键的过程中使过渡状态稳定。用一个简单的酶促催化的例子，碳酸酐酶使二氧化碳水化，就足以使这一基本原理具体化。



为什么碳酸酐酶能使这一反应加速百万倍以上？这种催化加速，部分是由于锌离子的作用，锌与此酶中 3 个组氨酸残基的咪唑环形成配位键。锌离子位于一个深的裂缝底部，距蛋白质表面约 15 Å。它的附近就是一个识别  $CO_2$  并与之结合的残基的基团。与锌离子结合的水迅即转变为羟基，羟基的位置恰好能攻击二氧化碳分子，二氧化碳被结合在紧邻羟基处。锌离子有助于  $CO_2$  的取向，也有助于提供一个极高的  $OH^-$  局部浓度。碳酸酐酶之所以像其他酶一样是一个高效的催化剂，是由于它使底物分子靠得非常近，并且使它们的取向达到对反应最优化的状态。另一种经常出现的催化机理是利用带电荷的基团使底物极化并且使过渡状态稳定。在以后几章中我们将详细研究酶促反应的机理。

有些最有趣和最重要的蛋白质有两个或更多个结合部位，它们彼此互通信息。在一个蛋白质分子中由于一种分子与一个部位结合而引起的构象变化能够改变远在 20 Å 之外的另一

个部位。因此，几个蛋白质可以组合在一起成为**分子开关**（molecular switch）以接收、整合和传递信号。许多种蛋白质有称为变构部位的调节部位，它控制着蛋白质与其他分子的结合并改变它们的催化速率。例如，血红蛋白中血红素基团与氧的结合就会因  $\text{H}^+$  和  $\text{CO}_2$  与此蛋白质中较远部位的结合而改变。与氧的结合对 pH 和二氧化碳浓度的这种依赖性使得血红蛋白成为非常有效的氧的转运体。蛋白质分子中由构象变化所传递的变构现象是代谢控制的中心环节。

含有彼此间由构象变化而相互偶联的一对部位的蛋白质具有将能量从一种形式转变为另一种形式的能力。假设一种蛋白质有一个催化部位，能将 ATP 水解为 ADP，这是一个在力学上有利的反应。把一个结合态的三磷酸基团变为二磷酸基团的变化会引起催化部位上的变化，而这种变化又会传递到这一蛋白质上距离稍远的另一个结合部位上。第二个部位的作用是：当 ADP 结合在第一个部位上时，它与另一蛋白质相结合；而当 ATP 结合上去时，它又把这一蛋白质释放出来。具有这些特性的酶，其功能可能是一种分子马达，把化学能转变为运动，像在肌肉收缩中那样。

### 第3章 蛋白质研究法

在前一章中,我们看到蛋白质在几乎所有的生物学过程中都起着关键的作用,即在催化作用、转运作用、相互协调的运动、兴奋性和生长与发育的控制中都起关键作用。这种范围极为广泛的功能来自于蛋白质之折叠成许多种明确的三维结构,因而能与各种各样的分子结合。生物化学的主要目标之一就是确定氨基酸顺序如何决定蛋白质的特定构象。我们也想要知道蛋白质如何与专一的底物和其他分子相结合,中介催化作用并转换能量和信息。

分析和纯化蛋白质的三种关键性的方法是电泳、超速离心和层析。给定一种纯蛋白质,就可能阐明其氨基酸顺序。窍门是将它切开,获得能够迅速测定其顺序的特定的片段。自动的顺序仪和重组 DNA 方法的应用提供了一大批氨基酸顺序的资料,这是开阔的新的前景。对于一级结构以外构象的研究,对于阐明蛋白质中原子的准确位置,X 射线结晶学是最为强有力的技术。还要了解蛋白质的生理作用,以便充分认识它如何执行其功能。抗体是可以选用的探针,可用以在体内给蛋白质定位并测定其含量。本章最终以肽的合成结束,这使得新药物和抗原的合成成为可能,而新的抗原则可用以诱导新的抗体的形成。

用这么许多物理的和化学的技术去研究蛋白质的结果,大大地丰富了我们对于生命的分子基础的了解,并使我们可能用分子的语言去讨论生物学中争论最厉害的问题。

#### 蛋白质可用凝胶电泳法分离并显示出来

带有净电荷的分子会在电场中移动。这一现象称为电泳,它提供了一种强有力的方法,可用以分离蛋白质和其他大分子,如 DNA 和 RNA。蛋白质(或任何分子)在电场中移动的速度( $v$ )依赖于电场强度( $E$ ),蛋白质上的净电荷( $z$ )和摩擦系数( $f$ )。

$$v = \frac{Ez}{f} \quad (1)$$

把带电荷的分子推向电荷符号相反的电极的电力  $Ez$  与  $fv$  相反, $fv$  是起源于移动着的分子与介质之间的摩擦的粘度拉力。摩擦系数  $f$  决定于移动着的分子的质量和形状以及介质的粘度。

电泳分离几乎总是在凝胶中而不是在自由的溶液中进行的,其理由有二。第一,凝胶抑制由于微小的温度梯度而造成的对流,这是有效的分离所要求的。第二,凝胶又起着分子筛的作用,这也促进分离。比凝胶中的孔小的分子极易通过凝胶而移动,而比孔大得多的分子则几乎是不能移动的。大小居中的分子则以各种不同的难易程度通过凝胶而移动。聚丙烯酰胺凝胶是用于电泳的入选的支持介质,因为它们化学上是惰性的而且极易由丙烯酰胺的聚合而制得。其次,可以选择聚合时丙烯酰胺和次甲基二丙烯酰胺(一种交联剂)的浓度,以控制凝胶中孔的大小。

在变性状态下,蛋白质主要是根据其质量大小而在聚丙烯酰胺凝胶电泳中被分离的。将蛋白质混合物首先溶于十二烷基硫酸钠(SDS)的溶液中,SDS 是一种阴离子去污剂,它能破坏



天然蛋白质中几乎所有非共价的相互作用。还加入乙硫醇或二硫苏糖醇，以还原二硫键。SDS 的阴离子与主链结合，其比例大约是一个 SDS 与两个氨基酸残基结合，这就使得 SDS 与变性的蛋白质形成一个净负电荷很多的复合物，其电荷大体上与蛋白质的质量成正比。与 SDS 结合后所获得的负电荷通常比天然蛋白质上的负电荷多得多，因而这些天然的电荷就显得无足轻重了。与变性蛋白所形成的 SDS 复合物然后在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，典型的形式是一薄的直立平板。电泳的方向是由上至下。最后，凝胶中的蛋白质可用银或染料（如考马斯蓝）染色而使之变成看得见的，于是得出一系列条带。把一片 X 光底片放在胶上就可检测出放射性的标记，这一过程称为放射自显影。小分子蛋白质通过凝胶移动得很快，而大分子则停留在顶部，靠近点样的地方。在这些情况下，大多数多肽链的迁移率与其质量（或分子量）的对数成正比。有些蛋白质不遵守这一经验的相互关系，例如，某些含糖类很多的蛋白质和膜蛋白的迁移就不规则。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳快速、灵敏、并且分辨率高。电泳和染色大约在一天内完成。只要少到  $0.1\mu\text{g}$  ( $\sim 2\text{pmol}$ ) 的蛋白质，在用考马斯蓝染色时就可显现出清晰的条带，而用银染色时，甚至更少 ( $\sim 0.02\mu\text{g}$ ) 的量都可测出。通常可以区别在质量上只差 2% 左右的蛋白质（例如 40 和 41kd，相差大约 10 个残基）。

还可根据其中酸性残基和碱性残基的相对含量而用电泳法分离蛋白质。蛋白质的等电点 (pI) 是其净电荷为零时的 pH。在此 pH 下，其电泳迁移率为零，因为方程式 (1) 中的  $z$  等于零。例如，细胞色素 *c*，一种碱性极强的传递电子的蛋白质，其 pI 为 10.6；而血清清蛋白，血液中的一种酸性蛋白质，其 pI 则为 4.8。假设有一蛋白质的混合物在无 SDS 的情况下在一凝胶中的 pH 梯度下进行电泳。每一种蛋白质都会移动直至达到凝胶中的 pH 等于其 pI 的那一位置时为止。根据其等电点而分离蛋白质的方法称为等电聚焦。先将具有多个 pI 值的多聚两性电解质（小分子的带有多个电荷的高聚物）的混合物进行电泳，以造成凝胶中的 pH 梯度。等电聚焦法可以将 pI 值之差小到 0.01 的蛋白质分开，这意味着彼此间差一个净电荷的蛋白质都可以被分开。

可将等电聚焦法与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合起来，以达到极高分辨率的分离。先将样品进行等电聚焦。然后将这块凝胶以水平位置放在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的顶部，垂直进行电泳，于是得到一双向的各个斑点的图谱。在这块凝胶上，在水平方向上蛋白质是根据其等电点而分开的，在垂直方向上则是根据其质量而分开的。值得注意的是，大肠杆菌中的一千多种蛋白质可用双向电泳法在一次实验中分开。

## 超速离心法在分离生物分子和测定其分子量方面是重要的

离心法是分离和分析细胞、细胞器和生物大分子的有效而且常用的方法。以角速度  $\omega$  作半径为  $r$  的圆周运动的颗粒受到一个等于  $\omega^2 r$  的离心力（向外）场的作用。作用于此颗粒上的离心力  $F_c$  等于其有效质量  $m'$  与离心力场的乘积。

$$F_c = m' \omega^2 r = m(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r \quad (2)$$

有效质量  $m'$  小于质量  $m$ ，因为被排除的液体对它施加一方向相反的力。这一浮力因子等于



$(1 - \bar{v}\rho)$ ，式中  $\bar{v}$  为此颗粒的偏比容， $\rho$  为溶液的密度。当  $F_c$  等于粘度拉力  $vf$  时，颗粒在此力场中以等速  $v$  移动， $f$  为颗粒的磨擦系数。因此，颗粒的移动速度（沉降速度）为

$$v = \frac{F_c}{f} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r}{f} \quad (3)$$

注意这一在离心场中运动的关系式和电场中运动的方程式（1）相像。

方程式（3）表明沉降速度与离心场的强度成正比。因此，有可能给沉降确定这样一种度量，它依赖于颗粒和溶液的性质而与样品运动得怎样快无关。**沉降系数**  $s$  被定义为速度除以离心力场，即

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f} \quad (4)$$

沉降系数通常以斯维德伯格单位（Svedberg unit）表示。一个斯维德伯格（S）等于  $10^{-13}$  秒。例如，假设有一 150kd 的抗体蛋白在半径为 8 厘米的超速离心机中以每分钟 75,000 转（rpm）旋转。在这一情况下的离心力场为  $4.9 \times 10^8$  厘米·秒<sup>-2</sup>，即约 500,000 倍于地心引力（g）。假若在这一力场中蛋白质的速度为  $3.4 \times 10^{-4}$  厘米/秒，则其沉降系数为 7S。

从方程式（3）可以得到几个重要的结论：

1. 一种颗粒的沉降系数与其质量成正比。形状和密度相同的蛋白质，200kd 的移动速度约为 100kd 的两倍。

2. 较密的颗粒比较松的颗粒移动得快，因为较密颗粒的起反作用的浮力较小。

3. 形状也是重要的，因为它影响粘度拉力。一个紧密颗粒的摩擦系数比质量相同的伸张开的颗粒的为小。带着损坏的不能张开的降落伞的跳伞运动员比带着张开的起作用的降落伞的运动员下降得快得多。

4. 沉降速度也依赖于溶液的密度（ $\rho$ ）。当  $\bar{v}\rho < 1$  时，颗粒下沉； $\bar{v}\rho > 1$  时，上浮； $\bar{v}\rho = 1$  时，不动。

一些生物大分子和细胞的 S 值如下：在 1 和 10 之间的，由小到大依次为：核糖核酸酶（12.4kd），血红蛋白（68 kd），血纤维蛋白原（330 kd）；10 和 100 之间的，大的核糖体 RNA（1,100 kd），大肠杆菌的核糖体（2,500 kd）；100 至 1000 的，烟草花叶病毒（40,000 kd）；细菌细胞略小于  $10^4$ ，溶菌体（一种为膜所包被的细胞器），差不多等  $10^4$ 。

现在我们来看一看如何用离心法来分离沉降系数不同的蛋白质。**区带离心法**的第一步是在离心管中形成一个密度梯度，做法是将不同比例的低密度溶液（如 5% 蔗糖）和高密度溶液（如 20% 蔗糖）相混合。这里密度梯度的作用是防止对流。然后将少量含有蛋白质混合物的溶液放在密度梯度的顶端。当离心机旋转时，蛋白质即通过密度梯度而移动，并根据其沉降系数而被分开。在跑得最快的蛋白质到达离心管底部之前停止离心。可在管底打一个洞并收集滴下来的溶液以收集各个已分开的蛋白质区带。可以测定液滴中的蛋白质含量和催化活性或其他功能特性。这种沉降速度技术可以很容易地将沉降系数相差一、两倍的蛋白质分开。

用**沉降平衡法**可以直接测定蛋白质的质量（分子量），其法是以低速离心样品，使沉降为扩散所抵消。这种情况会造成一个均匀的蛋白质浓度梯度。浓度对距旋转轴的距离的依赖性就代表颗粒的质量。质量（ $m$ ）如下式：

$$m = \frac{2kT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \log_2 c_2 / [c_1(r_2^2 - r_1^2)] \quad (5)$$

式中  $c_1$  和  $c_2$  为与旋转轴的距离为  $r_1$  和  $r_2$  处的浓度， $k$  为玻耳兹曼（Boltzmann）常数， $T$  为绝对

温度。测定分子量的这种沉降平衡技术是严格的，能应用于非变性的状态，此时多聚体蛋白质的天然状态是保持原样的。与此相反，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳提供了一种在变性条件下估计已解离的多肽链的分子量的方法。

## 重组 DNA 技术使蛋白质顺序的测定发生了根本变革

用埃德曼降解法利用由专一的裂解反应所产生的肽进行分析，得出了千百种蛋白质的顺序。蛋白质顺序的测定是费钱又费时的过程。阐明具有 1000 个以上残基的大蛋白质的顺序，常常需要作出惊人的努力。幸运的是，现在有了一种互补的解决办法，它是以重组 DNA 技术为基础的。正如将在第 6 章中讨论的，DNA 的长链可被克隆并测定其顺序。DNA 中 4 种碱基——腺嘌呤 (A)、胸嘧啶 (T)、鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C)——的顺序直接揭示由此基因或相应的信使 RNA 所编码的蛋白质中的氨基酸顺序。由读译 DNA 顺序而得出的氨基酸顺序只是新生的蛋白质的顺序，即核糖体中翻译机器的直接产物的顺序，核糖体的作用是按照信使 RNA 模板中的特定顺序把氨基酸连接起来。

如前所述，许多蛋白质在被合成后还要被加工。有些是在其末端加上一些残基，有的则是由一较大的原始多肽链裂解而产生的。在某些蛋白质中，半胱氨酸残基被氧化成二硫键，它可能在一条多肽链内，也可能在两条链之间。有些蛋白质的专门的侧链发生变化。例如，要到达膜的蛋白质通常有一连在专门的天冬酰胺侧链上的糖单位。由 DNA 顺序所推导出来的氨基酸顺序中富含信息，但并不能说明这种翻译后的修饰。还需要蛋白质本身的化学分析来描述这些变化的本质，而这种本质对大多数蛋白质的生物学活性是至关重要的。因此，DNA 顺序法和蛋白质的化学分析在阐明蛋白质功能的结构基础方面是互为补充的办法。重组 DNA 技术正在以惊人的速率提供大量氨基酸顺序的资料。现在已经知道了大约 3000 种蛋白质中一百万个以上氨基酸残基的顺序。按照目前的步伐，可以预期，在不到两年的时间内，已知顺序的蛋白质数目将要翻一番。

在分离出爱滋病 (AIDS, acquired immunodeficiency disease syndrome, 获得性免疫功能缺乏综合症) 病毒后不到一年，其全部核苷酸顺序就已被测定。下面是由此 RNA 基因组所特定的 DNA 顺序和相应的氨基酸顺序 (根据遗传密码推导出的)：

GGG		TTC		TTG		GGA		GCA		GCA		AGG		AAG		CAC		TAT		GGG	-	GCA	
甘		苯丙		亮		甘		丙		丙		甘		丝		苏		甲硫		甘		丙	

## 氨基酸顺序说明许多问题

氨基酸顺序在许多方面说明很多问题：

1. 可将所研究蛋白质的氨基酸顺序与所有其他已知的顺序相比较，以确定是否有重要的相似之处。这种蛋白质是否属于某个已确定的类别？例如，肌红蛋白和血红蛋白都属于珠蛋白类。糜蛋白酶和胰蛋白酶都是丝氨酸蛋白酶类的一员，这类蛋白酶有一共同的催化机理，其基础是一活性丝氨酸残基。寻找一种新测定其顺序的蛋白质与数千种顺序已被测定的蛋白质之间相似性，在个人电脑上大约只要二十分钟。但有时从这种比较中即可得到非常出人意料的结果。例如，曾发现有一种会引起敏感寄主生癌的病毒蛋白却与一种正常的细胞生长因子

几乎完全相同。这一光辉的发现把我们对于致癌基因和正常的细胞循环的认识推进了一大步。氨基酸顺序的比较也证明：高等生物的许多大蛋白质是由结构域组成的，而结构域又是由基因片段的融合而产生的。具有新特性的蛋白质就是由这些单位的新的组合而产生的。

2. 不同种中同一种蛋白质顺序的比较产生关于进化途径的大量信息。从不同种的蛋白质在顺序上的差异可以推测出它们的谱系关系，而两条进化路线分开的时间也可估计出来，因为随机突变具有类似时钟的特性。例如，比较灵长类的血清清蛋白指明人类和非洲类人猿仅在五百万年前才分开，而不是如以前所设想的那样是三千万年。这些顺序的分析为化石记录和人类进化途径的研究展现了新的前景。

3. 可以从氨基酸顺序中寻找内部重复的存在。许多蛋白质显然起源于一种原始基因的复制和以后的歧异化 (diversification)。例如，抗体分子是由一系列类似的结构域组成的，每一结构域由大约 108 个残基组成 (见前，图 33-15)。抗体中每一条 25 kd 的轻链是两个这样的单位构成的，而每一个 50 kd 的重链则是由四个单位组成的。蛋白质的氨基酸顺序表示它们的进化历史。

4. 氨基酸顺序中有一些信号决定着蛋白质的最终去处并控制着其加工。许多最终要被运出细胞的或运至膜中的蛋白质含有一信号顺序，在靠近氨基末端约 20 个疏水性残基的一段。把糖单位加入到天冬酰胺残基上的潜在部位可根据顺序中 Asn-X-Ser 和 Asn-X-Thr (X 表示任何残基) 的存在而鉴定出来。成对的碱基，如 Arg-Arg，表示蛋白酶切割的潜在部位，例如在胰岛素的前体胰岛素原中，情况就是如此。

5. 顺序的数据是制备对该蛋白质专一的抗体的基础。专一的抗体在测定蛋白质的量、确定其在细胞中的分布和克隆其基因方面都非常有用。

6. 在制造 DNA 探针方面氨基酸顺序也非常有价值，探针是对编码相应蛋白质的基因专一的。蛋白质的顺序分析是分子遗传学的不可分离的组成部分，正如 DNA 的克隆是蛋白质结构和功能分析的核心一样。

## X 射线结晶学在原子细节上揭示三维结构

(上略) 已有 200 种以上蛋白质的结构在原子分辨率水平上被阐明。关于它们的分子构造的知识已经对下列问题提供了深入的认识：蛋白质如何识别其它分子并与之结合，如何执行酶的功能，它们如何折叠，它们是如何发生的。这种丰富得出奇的收获正在快步增多，并且正在从根本上影响整个生物化学领域。其次，X 射线结晶学正在得到核磁共振波谱学 (NMR)、电子显微术和电子结晶学的补充，可能以高分辨率获得关于生物分子的越来越多的知识。我们将在本书中始终注意蛋白质和其他生物分子的三维结构，并把这些分子的结构与他们的生物学功能联系起来。

## 可用高度专一的抗体对蛋白质定量和定位

动物对称为抗原的外来物质发生反响而产生的一种蛋白质称为抗体 (第 35 章)。抗体 (亦称免疫球蛋白) 对于引发其合成的抗原有专一的亲和力。蛋白质类、多糖类和核酸类都是有效的抗原。也可以形成对于小分子 (例如合成的肽) 专一的抗体，只要这个小分子连接在

一个大分子载体上。被抗体识别的基团称为**抗原决定部位** (antigenic determinant 或 **epitope**)。动物有极其众多的产生抗体的细胞，每个细胞产生一种专一性单一的抗体。抗体的作用是刺激少数细胞的增殖，这少数细胞是已在形成互补的抗体的。血浆中主要类型的抗体是**免疫球蛋白 G**，一种 150 kd 的蛋白质，含有两个完全相同的结合抗体的部位。

将蛋白质注入家兔体内两次 (其间相隔三周)，即可获得能识别此特定蛋白的抗体。数周后取已被免疫的家兔的血，并离心。所得到的血清称为**免疫血清**，其中通常含有所需要的抗体。可以直接利用抗血清或其免疫球蛋白 G 部分。另一种办法是，用亲和层析法将对抗原专一的抗体分子提纯。用这种方法产生的抗体称为**多克隆抗体**——这就是说，他们是许多不同群体的产生抗体的细胞的产物，因而在对抗原的专一性和亲合性方面稍有不同。近年来的一项主要进展就是发现了获得**单克隆抗体**的方法 (第 35 章)，这种抗体可具有任何所需要的专一性。与多克隆抗体不同，单克隆抗体是均一的，因为它是由一个完全相同的细胞群体 (克隆) 所合成的。每一个这种群体是一个单独的**杂种瘤细胞**的后代，杂种瘤细胞则是由一个产生抗体的细胞与一个癌细胞融合而成的，癌细胞具有无限增殖的能力。

彼此相近的蛋白质可用抗体来区别；事实上，在表面上仅仅一个残基之差就可检查出来。抗体可用作极为专一的分析试剂，对蛋白质或其它抗体进行定量测定。在**固相免疫测定**中，对所研究蛋白质专一的抗体连接在一个高聚物的支持物 (如一片聚氯乙烯薄膜) 上 (图 III-3-35)。将一滴细胞提取物或血清样品或尿放在薄膜上，在形成抗体-抗原复合物后洗涤薄膜。然后加入对抗原的另一个部位专一的抗体，再洗薄膜一次。第二个抗体带有一放射性的或发荧光的标记，因而可被测定，灵敏度很高。结合在膜上的第二个抗体的量与样品中抗体的量成正比。如果将第二个抗体连在酶上，例如碱性磷酸酶上，测定的灵敏度甚至更高。这种酶能将所加入的无色物质迅速变为有色产物，或将不发荧光的底物变为荧光很强的产物 (图 III-3-36)。少于 1 纳克 ( $10^{-9}$  克) 的蛋白质可用这种酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定，极为迅速和方便。例如，在受孕后数天之内的即可对尿进行免疫测定，而判断是否已怀孕。测定的是人绒毛膜促性腺激素的存在，这是由胎盘产生的一种 37 kd 的蛋白质激素。

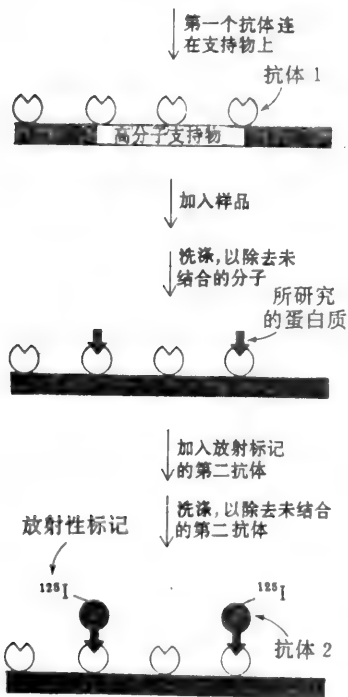
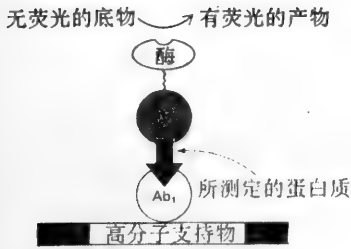


图 III-3-35 固相免疫测定。步骤为：将专一的抗体连在固体支持物上，加入样品，洗去可溶性化合物；加入放射标记的第二个抗体，它是对待测蛋白质的另一个部位专一的。



图Ⅲ-3-36 酶联免疫吸附测定(ELISA)步骤  
同图Ⅲ-3-35中的免疫测定,但连在第二个抗体上的不是放射性标记而是酶。由此酶的催化作用形成颜色极深的或有荧光的化合物。

细胞或体液中极少量待测蛋白质还可利用一种称为**蛋白质-蛋白质印迹法**或**Western 印迹法**(Western blotting)的免疫测定法检测。将样品在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。将凝胶上已分开的蛋白质转移(通过印迹法)到一片高聚物薄膜上,以使之更易与随后加入的抗体起反应,此抗体是对待测蛋白质专一的。然后可用第二个抗体冲洗薄膜,以检测膜上的抗体-抗原复合物,这第二抗体是对第一抗体专一的(例如能识别小鼠抗体的山羊抗体)。第二个抗体上的放射性标记在 X 光底片上产生一暗带(放射自显影图谱)。另一种办法是第二个抗体上的酶产生一有色产物,如 ELISA 法中那样。Western 印迹法使有可能在一个复杂的混合物中找到一种蛋白质,海底捞针!这一技术在基因克隆中应用极为有利。

抗体在确定蛋白质的空间分布方面也有价值。可用荧光标记的抗体给细胞染色,然后在**荧光显微镜**下观察,以揭示所研究蛋白质的定位。例如,用对肌动蛋白专一的抗体给细胞染色,就可看到一簇簇平行的束,肌动蛋白是聚合成丝的。肌动蛋白丝是细胞骨架的组分,细胞骨架是细胞内部的一种台架,它控制着细胞的形状和运动。由于可见光的波长所限,荧光显微术的最高分辨率为 0.2 微米(200 纳米或 2000 Å)左右。用带有电子密度高的标志的抗体和电子显微镜可达到更高的空间分辨率。例如,与抗体结合的铁蛋白极易用电子显微镜观察到,因为其中有一电子密度高的氢氧化铁的核心。金原子簇也可与抗体结合而使之在电镜下清晰可见。**免疫电镜技术**可确定抗体的位置,分辨率高达 10 纳米(100 Å)或更高。

## 用自动化固相法可以合成肽

合成顺序确定的肽是重要的,理由如下:第一,合成的肽能揭示蛋白质三维构象的形成规律。我们可以问:某一特定顺序本身是否折叠成  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -片或发卡式旋转或像是一个随机的线圈那样。第二,自然界的许多激素或其他信号分子是肽。例如,白血球是由甲酰甲硫胺酰肽类吸引到细菌上去的,这类肽来自于细菌蛋白的分解。合成的甲酰甲硫胺酰肽类在鉴定这类肽的细胞表面受体方面是有用的。可将合成的肽连在琼脂糖上,以制备亲和层析柱,用于纯化专一地识别这些肽的受体蛋白。第三,合成的肽可用作药物。加压素是一种肽类激素,它刺激肾脏中末梢的小管重新吸收水分,导致形成更浓的尿。糖尿病人缺乏加压素(亦称抗利尿激素),因此他们排出大量的尿(每天 5 升以上);而且由于大量失水,所以终日口渴。这种缺陷可注射 1-去氨基-8-D-精氨酸加压素而医治,这种合成的药物正是缺少的激素的类似物(图Ⅲ-3-40)。这种合成的肽在体内的降解比加压素的慢得多,而且更好的是,并不增高血压。第四,合成的肽可用作抗原,以刺激专一的抗体的形成。

肽的合成是把氨基连到羧基上,羧基先与一种试剂,如**二环己基碳二亚胺**(DCC,  $C_6H_5-N=C=NC_6H_5$ )反应,使之活化。游离氨基对已被活化的羧基的攻击导致肽键的形成和二环己基尿素的释放。假如只有一个氨基和一个羧基是可被利用的,那么就只能形成一种单一的产物。因此,有必要**阻断**(保护)所有其他可能发生反应的基团。例如,含有被活化的羧基的那

一组分的  $\alpha$ -氨基可用第三丁基氧羰基 ( $t$ -Boc),  $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-$ , 所阻断。这一  $t$ -Boc 保护性基团随后可被除去, 只要把肽放在稀酸中即可, 而肽键则保持完整。

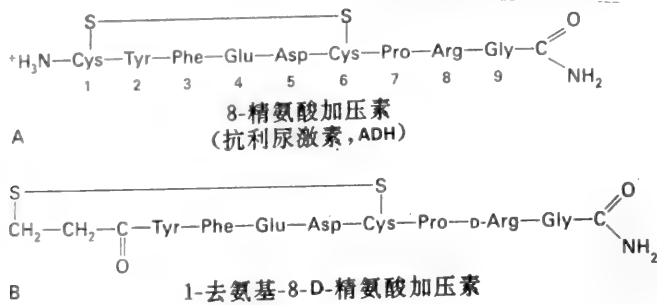


图 3-40 A. 加压素 (亦称抗利尿激素), 一种肽激素的结构式, 它促进水分的再吸收;  
B. 1-去氨基-8-D-精氨酸加压素, 更为稳定的合成的类似物的结构式。

用梅里菲尔德 (R. B. Merrifield) 所设计的固相法很易合成肽。将氨基酸一个个地加到正在生长的肽链上去, 肽链则连在一个不溶性的衬质上, 例如聚苯乙烯的珠子上。这种固相法的主要优点是所需要的产物在每一个阶段都是结合在珠子上的, 而珠子则可迅速被过滤和洗涤, 因而不需要纯化中间产物。所有的反应均在一个容器中进行, 这就避免了因重复转移产物所造成的损失。所需的肽顺序中羧基末端的氨基酸首先被固定在聚苯乙烯的珠子上。这一氨基酸的  $t$ -Boc 保护性基团然后被除去。再将下一个氨基酸 (以被  $t$ -Boc 保护的形式) 连同偶联剂 DCC 一道加进来。形成肽键之后, 将多余的试剂和 DCC 洗掉, 留下的是所需要的二肽产物。用同样的反应顺序将更多的氨基酸连上去。在合成终了时, 加入 HF 使肽从珠子上释放出来, HF 打断与珠子连结的羧基的酯键而不破坏肽键。在潜在的活性侧链, 如赖氨酸上的保护性基团, 也在这时被去掉。这一反应的循环很容易自动化, 这就使得它能进行日常的工作, 合成含有大约 50 个残基的肽, 产量和纯度都高。实际上, 梅里菲尔德已合成了干扰素 (155 个残基) 和核糖核酸酶 (124 个残基), 前者有抗病毒活性, 后者有催化活性。



## 第 4 章 DNA 和 RNA：遗传的分子

### 有些病毒在其生活史中某一阶段有单链 DNA

并非所有 DNA 都是双链的。辛沙梅 (R. Sinsheimer) 发现一种感染大肠杆菌的小分子病毒  $\phi$ X174 的 DNA 是单链的。有几项实验结果导致了这一出人意料的结论。第一, 在  $\phi$ X174DNA 中碱基的比例不符合  $[A] = [T]$  和  $[G] = [C]$  这一规则。第二,  $\phi$ X174DNA 的溶液的粘度比同样浓度的大肠杆菌 DNA 的粘度小。 $\phi$ X174DNA 的流体动力学特性和随机卷曲的高分子的一样。DNA 双螺旋则与其相反, 它的流体动力学行为像刚性很强的棒状物一样。第三,  $\phi$ X174DNA 的碱基中的氨基极易与甲醛反应, 而双螺旋 DNA 中的碱基则实质上不能与此试剂接触。

这一单链 DNA 的发现使人怀疑沃森和克里克所提出的半保留复制图式是否具有普遍性。不过, 不久就证明了  $\phi$ X174DNA 只是在病毒的生活史中的一段时间内是单链的。辛沙梅发现被感染的大肠杆菌细胞含有  $\phi$ X174DNA 的双链形式。这一双螺旋 DNA 称为复制型, 因为其作用是作为合成后代病毒的 DNA 的模板。由于发现了这种双链的病毒 DNA 的中间体, 沃森-克里克的 DNA 复制图式的普遍性得到了进一步的证实。

### 某些病毒的基因是由 RNA 组成的

所有原核生物和真核生物的基因都是由 DNA 组成的。在病毒中, 基因或是由 DNA 或是由 RNA (核糖核酸) 组成。RNA 也像 DNA 一样是长的不分枝的高分子, 由核苷酸以  $3' \rightarrow 5'$  磷酸双酯键连结而成。RNA 的共价结构在两个方面与 DNA 的不同。正如其名称所示, RNA 中的糖单位是核糖而不是去氧核糖。核糖含有一  $2'$ -羟基, 去氧核糖中没有。另一区别是 RNA 中 4 个主要碱基之一是尿嘧啶 (U) 而不是胸嘧啶 (T)。尿嘧啶也如胸嘧啶一样, 能与腺嘌呤成为一对碱基, 但是它没有胸嘧啶中的氨基。RNA 分子可以是单链的或双链的。RNA 不能形成 B-DNA 类型的双螺旋, 因为其核糖单位中的  $2'$ -羟基有空间干扰。不过, RNA 可以采取一种变态的双螺旋形式, 使碱基对偏离双螺旋轴垂直线  $20^\circ$ , 一种类似 A-DNA 的结构 (第 27 章)。

感染烟草叶片的烟草花叶病毒是鉴定得最清楚的 RNA 病毒之一。它由一单链 RNA (6390 核苷酸) 和包在外面的一个蛋白质外壳组成, 外壳由 2130 个相同的亚基组成 (参看第 34 章关于其结构和组装的讨论)。用酚处理病毒可使蛋白质与 RNA 分开。分离的病毒 RNA 有感染力, 而病毒蛋白则否。合成的杂交病毒颗粒提供了进一步的证据, 证明病毒的遗传专一性完全在其 RNA 上。已知各种各样株系的烟草花叶病毒。曾用株系 1 的 RNA 和株系 2 的蛋白质合成了杂交的病毒。另一种杂交病毒是由株系 2 的 RNA 和株系 1 的蛋白质制成的。感染后, 后代的病毒总是由相当于用以进行感染的杂交 RNA 中的 RNA 和蛋白质组成。

在一被感染的植物细胞中烟草花叶病毒的复制是首先合成一（-）RNA 链，它与病毒颗粒中的（+）RNA 链互补。然后（-）RNA 链即作为模板，用以合成大量的（+）RNA 链，这些（+）链被装在新的病毒颗粒中而被释放出细胞。这些合成是由 RNA 聚合酶所催化的，这种酶按 RNA 模板的指令行事（RNA-指导的 RNA 聚合酶）。

## RNA 肿瘤病毒通过双螺旋的 DNA 中间体而复制

许多 RNA 病毒在感染了敏感的动物寄主后会产生恶性肿瘤。劳氏肉瘤病毒就是这类 RNA 肿瘤病毒中研究得最清楚的一种，它含有一单链 RNA（第 34 章）。RNA 肿瘤病毒的一个显著特点就是它们通过 DNA 中间体而复制。称为（+）链的病毒颗粒的 RNA 被传入寄主细胞中。这一（+）RNA 是合成与之互补的（-）DNA 链的模板，此合成由反转录酶催化，此酶是由病毒颗粒为这一特殊目的而带入细胞的。反转录酶是 RNA-指导的 DNA 聚合酶。在这种情况下，遗传信息由 RNA 流向 DNA，与正常的信息传递的方向相反（催化此异常步骤的酶即因此而得名）。然后（-）DNA 即成为（+）DNA 合成的模板。所产生的病毒基因组的双链 DNA 复本即掺入到寄主的染色体 DNA 中，并在细胞分裂过程中与正常的细胞 DNA 一道被复制。在以后的某一时刻，整合的病毒基因组被表达而形成病毒（+）RNA 和病毒蛋白，它们再组装成病毒颗粒。RNA 肿瘤病毒也称为反转病毒，因为其遗传信息由 RNA 流向 DNA。



## 第5章 遗传信息流

### 许多真核基因是内含子和外显子的镶嵌物

(上略) 剪接是一复杂的过程, 是由**剪接体** (spliceosome) 进行的, 这是蛋白质和小分子 RNA 组装而成的 (第 29 章)。这种酶的机器识别新生 RNA 中专门指定剪接部位的信号。**内含子**几乎总是以 GU 开始而以 AG 终结, AG 之前是富含嘧啶的一小段 (图 III-5-22)。这一套顺序就是剪接信号的一部分。

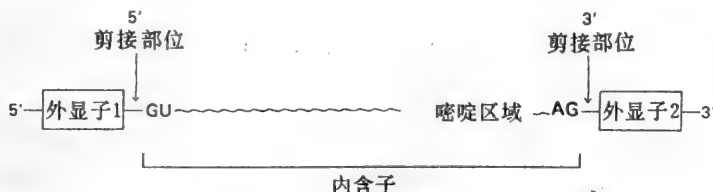


图 III-5-22 剪接 mRNA 前体的一套顺序。

### 许多外显子编码蛋白质结构域

高等真核生物, 例如鸟类和哺乳类的许多基因是分裂的。低等真核生物如酵母, 则有比例高得多的连续基因。在真细菌例如大肠杆菌中尚未发现分裂的基因。在高等生物的进化过程中内含子插入到基因中去了吗? 或者内含子已被除去了因而在原核生物和低等真核生物中形成了流线型的基因组? 为在进化过程中为高度保守的蛋白质编码的基因中的 DNA 顺序比较有力地说明: 内含子存在于祖先的基因中, 而在那些在进化过程中已优化成非常迅速地生长的生物体, 如真细菌类和酵母中, 内含子丢失了。某些基因中内含子的位置已存在了至少十亿年。其次, 在真菌、植物和脊椎动物分道扬镳之前就已出现了剪接的机理, 哺乳动物细胞提取物能剪接酵母 RNA 这一发现就证明了这一点。

许多外显子为蛋白质的分散的结构和功能单位编码。例如, 肌红蛋白和血红蛋白基因的中央外显子为一个与血红素结合的区域编码, 此区域可逆地与  $O_2$  结合。其他外显子专一地编码  $\alpha$ -螺旋片段, 这些片段使蛋白质插在细胞膜中。蛋白质的一整个结构域可能是由一单个外显子编码的。有一引人入胜的假说是: 在进化过程中新蛋白质的出现是由于外显子的重新排列, 这些外显子编码分散的结构单位、结合部位和催化部位。外显子的混合是产生新基因的迅速而又有效的方法, 因为它保留了功能单位; 但允许它们以新的方式相互作用。内含子是广大的区域, 在其中 DNA 可以破裂和重组而对所编码的蛋白质并无损害作用。反之, 不同

外显子间顺序的交换则常会导致功能的丧失。**基因复制**是另一种增加生物体内遗传潜势的方法。复制出来的基因可发生多种多样的变化,而原来的基因则继续执行其生命功能。最后,基因可因**点突变**而发生变化,点突变一次改变一个核苷酸,通常是引起一个氨基酸残基被取代。

**分裂的基因**所具有的另一优点,是通过以不同方式剪接新生的 RNA 转录本而产生一系列相关蛋白质的潜在能力。例如,一产生抗体的细胞的前体会形成插在细胞质膜中的抗体。被所连接的抗体识别的外来的专一抗原刺激这种细胞便会引起细胞的分化和增殖。被活化的产生抗体的细胞然后就会以另一种方式剪接其新生的 RNA 转录本而形成可溶性的抗体分子,这些分子被分泌出细胞之外,而不是保留在细胞表面上。我们在这里看到了高等生物体内内含子和外显子的复杂排列所带来的优越性的一个清楚不过的例子。**不同方式的剪接是形成一组蛋白质的途径**,这组蛋白质是根据一个发育程序而发生的一个基本特性的变异。

## 在进化过程中 RNA 可能出现在 DNA 和蛋白质之前

遗传信息从 DNA 流向 RNA 再流向蛋白质依赖于酶和其它蛋白质与核酸的精巧的相互作用。同样, DNA 和 RNA 的复制也是以聚合酶和其他蛋白质与核酸模板的相互作用为媒介的。在生命进化的早期还没有酶时核酸分子又是如何复制的呢?这一难解之谜的可能答案来自近年来的发现:**RNA 分子和蛋白质一样可能是酶**。塞克 (T. Cech) 发现四膜虫 (Tetrahymena, 一种有鞭毛的原生动物) 中核糖体 RNA 的前体发生自我剪接 (第 29 章)。这一前体 RNA 分子中的内含子被 RNA 本身的催化作用所准确地除去。这一释放出来的内含子然后丢掉一段短的 5'-末端顺序,形成一 395 核苷酸的 RNA 分子,此分子又催化其它 RNA 分子的转化。这种由内含子衍生出来的 RNA 催化 RNA 链在特定部位的切开和联结,而它自身却不被消耗。因此,它是真正的酶。已知有一个世纪的蛋白质催化剂,现在又加上了 RNA 催化剂核酸性酶 (ribozyme)。

这一革命性的发现使我们看到了,在 DNA 和蛋白质出现之前生命进化的早期有一个 RNA 世界。吉尔伯特 (W. Gilbert) 提出: RNA 分子先催化其本身的复制,并发展出许许多多酶活性。下一阶段, RNA 分子开始合成蛋白质,蛋白质成了优越性高的酶,因为它们有 20 个侧链,比 RNA 的 4 个碱基更为多样化。最后,由 RNA 的反转录形成了 DNA。DNA 代替了 RNA 作为遗传物质,因为它的双螺旋比单链的 RNA 更为稳定,而且也是遗传信息的可靠的贮藏所。到这时,留给 RNA 的作用就是一直保留到现在的功能:信息载体 (mRNA) 和蛋白质合成中的连接体 (tRNA),以及为基因表达作媒介的一些组装品的组分 (例如,核糖体中的 rRNA)。今天的由基因到蛋白质的精巧的 (实在是奇怪的) 信息传递机制,其实是一部古老的剧本,它大概出现于 RNA 独自编写剧本、导演并扮演所有关键角色的时候。

## 第6章 基因研究技术：DNA 的分析、组建和克隆

(胡美浩 译, 吴相钰 校)

70年代初期, DNA重组技术已成为一种研究生命的主要分子的新方法。由于DNA重组技术提供了有效的分析和改变基因和蛋白质的方法, 它引起了生物化学的革命。现在可以按照设计好的方案准确地改变有机体的遗传功能。基因重组技术是几十年来对DNA、RNA和病毒进行基础研究的结果。它所依靠的首先是能够切断、连接和复制DNA的以及反转录RNA的酶。前几章已经讨论了DNA聚合酶和反转录酶。本章开始讨论限制性酶。这种酶可以把很长的DNA分子切成可以进行操作的特异片段。有了许多种限制性酶和DNA连接酶——一种连接DNA链的酶——就有可能把DNA顺序作为组件来处理, 并随意将其从一个DNA分子移至另一个DNA分子。因此DNA重组技术是以核酸酶学为基础的。

第二个基础是碱基对语言。它是核酸识别的媒介。我们已经看到用互补的DNA或RNA探针杂交是一个探测特异核苷酸顺序的灵敏而有效的方法。在DNA重组技术中, 碱基对用于组建新的组合DNA, 同时也用于探测特殊的核苷酸顺序。这个革命性的技术也严格地依赖于病毒的存在以及有关病毒与敏感宿主间相互作用的详细知识。病毒是最终的寄生者。它们将它们自己的DNA(或RNA)有效地传递到宿主中去, 复制病毒基因组, 以产生病毒蛋白质, 或是将病毒DNA合并到宿主基因组中去, 以破坏宿主。同样, 质粒——他们是副染色体——已经在DNA重组技术中成为不可缺少的了。

这一章还介绍一些这些新方法的优越之处。例如, 限制性酶的发现导致DNA快速顺序分析技术的发展。许多关于基因组织、基因表达的调控和蛋白质结构的信息来自于上百万的病毒、细菌和高等生物DNA分子的碱基顺序的分析。DNA分子也可以从头合成。DNA的自动固相合成法提供了专一性高的探针和人工合成的特制基因。这章的最后一部分涉及新组合基因的结构和克隆。新基因可被宿主细胞有效地表达, 例如由细菌生产的人胰岛素。更有甚者, 可以在体外产生特殊的突变, 按照设计进行蛋白质工程。

### 可用凝胶电泳将限制性酶切片段分开并观察

由于DNA分子的限制性酶切片段可以用凝胶电泳分开和显示, 所以很易检测出相关DNA分子间的很小差异。在许多类型的凝胶电泳中, DNA片段的迁移率, 在一定限度之内, 与其碱基对数目的对数成反比。用聚丙烯酰胺胶来分离1000碱基对以下的片段。而用孔多的琼脂糖凝胶来分离大一些的片段(可达20 kb)。这些凝胶的重要特点是它们的分辨率高。某些胶可以从长为几百个核苷酸的片段中分辨出一个核苷酸的差异。此外, 现在可以用方向不同的交变电场的凝胶电泳将含有数百万核苷酸的整个染色体分开。胶上含有放射性DNA的

条带或斑点,可用放射自显影显示。另一种办法是用溴乙锭染色,溴乙锭与双螺旋 DNA 结合后可发出强的橙色荧光。仅含 50ng DNA 的条带用此法很易看到。

含有特定碱基顺序的限制性酶切片段,可用另一标记的与之互补的 DNA 链与之杂交以进行鉴定。混在一起的限制性酶切片段,可用琼脂糖电泳分开,再使之变性为单链 DNA,再转移到一张硝酸纤维素膜上。DNA 片段在胶上的位置就保留在硝酸纤维素膜上。在此膜上这些 DNA 片段可以用<sup>32</sup>P 标记的单链 DNA 探针去杂交。用放射自显影即可显示那些与探针的顺序互补的限制性酶切片段的位置。用这个方法很容易将百万片段中间的一个特殊片段鉴定出来,就像从一堆干草堆中寻出一颗针一样。这种效力极高技术就叫做 **Southern 印迹法**,因为它是由 E. M. Southern 发明的。同样,也可以用凝胶电泳分离 RNA,将特殊片段转移到硝酸纤维素膜上之后,用杂交法来鉴定它。这个类似的分析 RNA 的技术被古怪地称做 **Northern 印迹法**。进一步的文字游戏,即 **Western 印迹法**是用来称呼一种鉴定蛋白质的技术。这种技术是用特殊的抗体对此蛋白进行染色。Southern, Northern 和 Western 印迹法也叫做 DNA, RNA 和蛋白质印迹法。

### 限制性酶切片段长度的多型性 (RFLP)

Southern 印迹法可用来追踪某选定基因的遗传特征。在限制性酶切位点内的突变会改变限制性酶切片段的大小,因而改变了 Southern 印迹分析中 DNA 条带的位置。在一个群体中存在着遗传的多样性,称为多型性。所检测到的突变本身就可能引起疾病或者与可以引起疾病的突变紧密相连。例如镰刀形血细胞贫血、囊性纤维变性 (cystic fibrosis) 和亨丁顿氏 (Huntington) 舞蹈病这些遗传病均可用 RFLP 分析法检测。

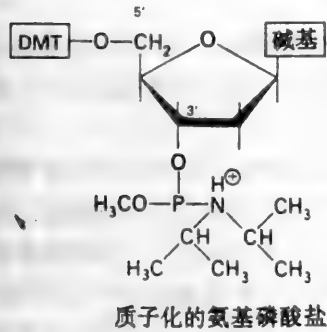
### 可用有控制地干扰复制的方法 (桑格双脱氧法) 测定 DNA 的顺序

(上略) 1977 年桑格及同事用这个方法测定了  $\phi$ X174DNA 的 5386 个碱基对的全部顺序。这正好是桑格首次阐明一种蛋白质的氨基酸顺序的开拓性工作之后 1/4 世纪。这一成就是分子生物学的一个里程碑,因为它阐明了一个 DNA 基因组的全部信息。几年之后,另一个成就就是确定了人线粒体 DNA 顺序,这是含有 16,569 个碱基对的双链环状 DNA,编码 2 种核糖体 RNA、22 种转移 RNA 和 13 种蛋白质。紧接着的成就测定了  $\lambda$  噬菌体的 48,513 对碱基的 DNA。 $\phi$ X174 是一种能感染大肠杆菌的病毒。从这些显著的成就所得到的大量信息将在以后各章中详细介绍。

自从使用了马克赛姆-吉尔伯特和桑格的顺序分析方法以后,在全世界的各个实验室中已经分析了将近  $5 \times 10^6$  个碱基顺序。所有这些研究都应用了凝胶的放射自显影来确定 DNA 片段的长度。这些 DNA 片段是用化学方法切断或是有控制地干扰 DNA 复制而产生的。现在又设计了另外一种双脱氧法。将荧光标签连在寡聚核苷酸引物上——4 种链终止反应混合物中的每一种都具有不同的颜色 (例如,终止在 A 是蓝色荧光发射体,终止在 C 的是红色的),将这些反应混合物混在一起进行电泳。当每一个分开的 DNA 条带通过管的底部时,就可以检测其荧光。颜色的顺序直接产生碱基顺序。因这个方法可以测定多达 500 个碱基顺序。荧光测

定方法的吸引人之处在于它很易自动化。现在测定大肠杆菌基因组全部顺序 ( $3 \times 10^6$  碱基对) 已有可能。我们甚至可以开始考虑测定极长的人的基因顺序, 它含有  $3 \times 10^9$  碱基对。

### 用自动化的固相方法可合成 DNA 探针和基因



(5'-羟基被一个二甲氧基三苯甲基保护基团封闭)

DNA 链, 像多肽一样, 可以一个一个地把活化的单体加到一个延长中的链上而将其合成, 这个链则连在不溶性的支持物上。这个活化的单体是一个质子化的 3'-氨基磷酸脱氧核苷酸。第一步, 要加上去的单体的 3'-磷原子与延长中的链的 5'-氧形成亚磷酸三酯。活化的单体的 5'-OH 不起反应, 因为它已被一个二甲氧基三苯甲基保护基团封闭起来了。同样在嘌呤和嘧啶碱基上的氨基基团也被封闭了。偶联反应是在无水条件下进行的, 因为水可以和氨基磷酸盐相作用。在第二步中, 亚磷酸三酯 (其中 P 是三价) 被碘氧化形成磷酸三酯 (其中 P 是 5 价)。第三步中,

在正在生成的链的 5'-OH 上的 DMT 保护基团由于加入了二氯乙酸而被除去, 其它保护基团则保持完整。这时 DNA 链延伸了一个单元, 准备着下一轮的加成反应。每加一轮单体仅需十分多钟, 链可以延长到 98% 以上。

正像对多肽一样, 固相方法对合成 DNA 是很理想的, 因为预期的产物一直停留在不溶的支持物上, 直到最后的释放步骤。所有反应都在一个容器中进行, 可加入过量的可溶性试剂, 以促使反应完全。每一步的最后, 可以从载有生长链的玻璃珠上洗掉可溶性试剂和副产物。

当预期的 DNA 组装好以后, 加入硫酚以除去保护磷酸的甲基基团。过后将末端核苷的 3'-OH 和与玻璃支持物相连的树脂之间的酯键切断, 使 DNA 链从玻璃珠上下来。这个酯键是加入浓氨水而被水解的。最后在氨水中将 DNA 加热, 以除去保护碱基的苯甲酰及异丁酰基团。由于延伸反应永远不会 100% 地完全, 所以新合成的 DNA 链长度不同——而所需要的链则是最长的。样品可用高效液相色谱法纯化或用聚丙烯酰胺电泳法纯化。用这种自动化方法极易合成多达 100 个核苷酸的 DNA 链。

能快速合成任何选定顺序的 DNA 链开辟了许多实验途径。例如, 用一个一端为  $^{32}\text{P}$  标记的寡聚核苷酸可寻找一个很长的 DNA 分子中的, 甚至于许多个染色体的基因组中的互补顺序。标记的寡聚核苷酸作为 DNA 探针的用途很大, 也很普遍。例如与染色体中的已知顺序互补的 DNA 探针, 就能用来作为一个起点, 探讨附近未绘出的 DNA。又如, 探针可作为引物, 开始复制相邻的 DNA, 复制由 DNA 聚合酶催化。固相方法的一项最激动人心的应用, 就是合成新剪裁的基因。由于使人工合成的基因进行表达, 现在可以大量产生具有新的性质的新的蛋白质。蛋白质工程已成为现实。更有甚者, 可以随便改变 DNA 中的调节顺序, 以控制基因的表达。

### 新的基因组可被重组、克隆和表达

伯格 (P. Berg)、波以耳 (H. Boyer) 和科恩 (S. Cohen) 在 70 年代初的开创性工作导致了

DNA 重组技术的发展,这项工作引起了生物化学的革命。用 DNA 重组技术可在实验室中将无关的基因进行新的重组构建。这些新组合的 DNA 可被克隆和扩增很多倍,方法是将其引入适当的细胞中。在其中由 DNA 的合成机器进行复制。插入的基因常在他们的新环境中转录和翻译。最引人注意的是宿主的遗传性能可以按照设计路线发生永久的改变。

DNA 克隆的主要步骤是:

1. **重组分子的构建:** 将所研究的 DNA 片段共价连接到 DNA 的载体上。载体的必要特点是它可以在适当的宿主中自动地复制。质粒(天然存在的环形 DNA,其作用是副染色体)和  $\lambda$  噬菌体(一种病毒)被选定作为克隆到 *E. coli* 中的载体。

2. **引入宿主细胞:** 许多细菌和真核细胞从培养基中取进裸露的 DNA。这种取进的效率很低(约  $10^6$  DNA 分子中有一个),但是适当比例的细胞可以在适当的实验条件下发生转化。常用那些不迅速降解外源 DNA 的突变细菌作为宿主菌。也可将 DNA 分子注入许多动物和植物细胞中。或者可用病毒颗粒感染靶细胞,这些颗粒是重新组装,以容纳重组的 DNA 分子的。在这个合成的病毒基因组中,所研究的基因代替了一段病毒 DNA,这段 DNA 对复制是不需要的。

3. **筛选:** 下一步就是要确定哪些细胞可以容纳含有所研究基因的重组 DNA 分子。可以根据载体的有无或是所插入基因本身的有无来选择所要的细胞。例如,一些质粒载体具有对某一抗菌素的抗性,这就可用来消除不需要的细胞。另外一种方法就是培养单个细胞,然后用标记的互补探针,以 Southern 印迹法,从每一个克隆样品中测试所要的 DNA 顺序。用专一的抗体以 Western 印迹法可以检验表达出来的蛋白质,或是测试功能特性,如检测功能性的酶活性也可检验表达出来的蛋白。许多含有重组 DNA 的细胞系在遗传上是稳定的。镶嵌 DNA (Chimeric DNA) 为含有无关的基因的 DNA 分子。此字来自 Chimera,一种神话动物,狮头羊身蛇尾。

### 限制性酶和 DNA 连接酶是重组 DNA 分子的关键性工具

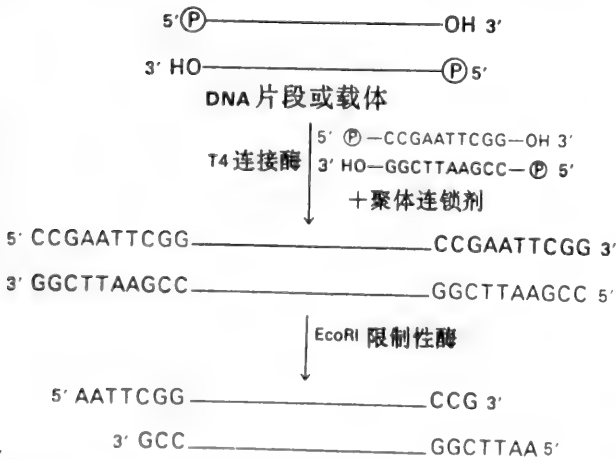


图 11-6-13 加上和切开化学合成的连接剂,以形成粘性末端。

首先,我们来观察在实验室中新 DNA 分子是如何组建的。在 DNA 重组实验中,用于剪接的载体的制备法是用限制性酶将其在单个的专一的位点上切开。例如,质粒 pSC101 (一个 9.9 kb 的双螺旋的环状 DNA 分子)就是用 EcoRI 限制性酶在一个专一的位点切开的。这种酶所造成的错开的切口就会产生互补的单链末端,这种特殊末端彼此有专一的亲和性,因此称为粘性末端。可将任何 DNA 片段插入这个质粒,只要这个片段含有同样的粘性末端。从较大的一片 DNA 上也可用限制性酶切下这样一个片段



来。所用的限制性酶与切开质粒 DNA 所用的限制性酶是一样的。这个片段的单链末端就是与被切开的质粒互补的。这个 DNA 片段和被切开的质粒相互退火,并用 DNA 连接酶连接起来,这种酶在两个 DNA 链之间形成磷酸二酯键(前图 31-19)。DNA 连接酶要求 DNA 链的 3'-端是自由 OH 基团,另一条链的 5'端是磷酸基团。此外,被连接酶连接的链必须是双螺旋链 DNA 分子。连接反应需要 ATP 或是  $\text{NAD}^+$  作为能源。这个反应将在 27 章讨论。

将 DNA 分子连接起来的粘性末端方法可以用一个短的、化学合成的 DNA 连接剂(linker)进行而得到普遍的使用。这种连接剂是可以有限制性酶切开的。首先,使连接剂与一个 DNA 片段或是载体的末端共价连接。例如,用多核苷酸激酶将十聚体的连接剂和 DNA 分子的 5'端磷酸化,然后再用 T4 连接酶进行连接(图 III-6-13)。此连接酶可以在双螺旋 DNA 分子的钝端(齐头末端)之间形成共价键。当这些延伸的终端被适当的限制性酶切开时就产生粘性末端。因此,相应于一个特定限制性酶的粘性末端,实际上可以加到任何 DNA 分子上去。这里我们看到将酶学和化学合成方法结合起来在精巧地制作新 DNA 分子方面的成果。

## 质粒和 $\lambda$ 噬菌体被选作在细菌中 克隆 DNA 的载体

巧妙地修饰许多质粒和噬菌体可以促进重组 DNA 分子之进入细菌,并有利于筛选能容纳这些质粒和噬菌体的细菌。质粒是天然存在的环状双链 DNA 分子,大小范围为两千到几万个碱基。它们带有钝化抗菌素、产生毒素和分解天然产物的基因。这些副染色体能够不依赖于宿主染色体而进行复制。与宿主基因组不同,它们在某些条件下是非必需的。一个细菌细胞可以没有任何质粒,也可以收藏多达 20 个拷贝的质粒。一种对克隆最有用的质粒是 pBR322,它含有抗四环素和抗氨苄青霉素(类似于青霉素)的基因。这个质粒可以被不同的内切酶在不同的独特位点上切开,并插入 DNA 片段。在 EcoRI 位点插入 DNA 不能改变任何抗菌素基因(前图 31-22)。然而在 Hind III、Sal I 或 BamH I 限制性酶切位点插入 DNA,则可使抗四环素基因失活,这称为插入失活反应。可在 pBR322 的这些位点中的任一个之上插入 DNA,含有这种 pBR322 的细胞对氨苄青霉素有抗性但对四环素敏感,所以它们很容易被筛选。未能吸收这个载体的细胞对两种抗菌素都敏感,而含有未插入 DNA 片段的 pBR322 的细胞则可对两种抗菌素都有抗性。

$\lambda$  噬菌体是另一种广泛应用的载体。这种细菌噬菌体可以选择生活型式:它可以破坏它的宿主,或是它可以成为宿主的一部分(第 34 章)。在溶菌途径中,病毒功能全部表达:很快地产生病毒 DNA 和蛋白质,并包装到病毒颗粒中去,从而引起溶菌(破坏),而且突然出现约 100 个后代病毒颗粒,或称病毒粒子(virions)。在溶原途径中,噬菌体 DNA 插入到宿主基因组中,而且和宿主细胞 DNA 一起复制很多代,一直没有病毒活性。某些环境因素可以激活这个潜伏的病毒表达,从而形成子代病毒,使宿主溶菌。 $\lambda$  噬菌体的 48 kb 碱基的 DNA 大片段对繁殖和感染是不重要的,因此可以被外源 DNA 替代。

现已构建了为克隆 DNA 所用的  $\lambda$  噬菌体的突变体。有一个突变体叫做  $\lambda$  gt- $\lambda$   $\beta$ , 仅含有两个 EcoRI 酶切位点,而正常的有五个(前图 31-24)。在酶切之后,可将  $\lambda$  DNA 分子的中间一段移去,剩下的两个片段的共同长度等于正常基因组长度的 72%。这样的 DNA 量太少了,不易被包装入  $\lambda$  颗粒。易被包装的 DNA 长度范围是正常基因组长度的 75—105%。然而,在这

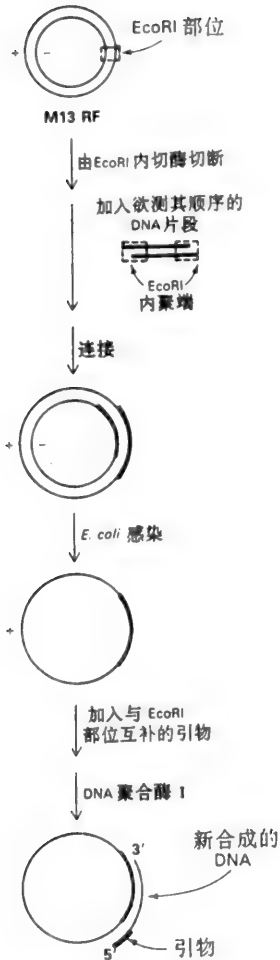


图 Ⅲ-6-18 对插入到 M13 噬菌体 DNA 中的 DNA 片段用双脱氧法测序。新 DNA 合成以寡聚核苷酸为引物。此寡聚核苷酸与插入的 DNA 相邻的限制性酶顺序互补。

于长期繁殖重组 DNA，因为长于 1kb 的插入片段不能稳定地保持下去。

## 从酶解的基因组 DNA 中可克隆到特殊的基因

巧妙的克隆和筛选方法使得从基因组中分离几千碱基长的特殊片段成为可能。这种片段可超过  $3 \times 10^6$  kb。让我们来看一看，在人的基因组中只出现一次的基因如何能被克隆出来。全基因组的样品首先被机械破碎，或是被限制性内切酶部分酶解成大片段（前图 31-25）。这些随机地相重叠的 DNA 分子被凝胶电泳分开成一整套各约 20kb 长的片段。将合成的连接剂连

两端的  $\lambda$  DNA 中间加入一个适当长度的 DNA 插入片段（如 10 kb），可使这样一个重组 DNA 分子（正常长度的 93%）被包装：几乎所有按这种方法形成的有感染性的  $\lambda$  颗粒都含有插入的外源 DNA 片段。用这些修饰了的病毒作为载体的另一个优点是它们进入细菌要比质粒容易得多。已经组成了许多不同的  $\lambda$  突变体用作克隆载体。它们中的一种被叫做装配型质粒（cosmid），可以作为插入大 DNA 片段的载体（插入片段可达 45 kb）。

M13 噬菌体是另一种非常有用的克隆 DNA 的载体。这种带鞭毛的病毒长 900nm，宽 9nm。它的 6.4 kb 的单链环状 DNA 被 2710 个同样的蛋白质亚基的外壳所保护。M13 通过细菌的性菌毛（sex pilus）进入 *E. coli*。这种菌毛是一种蛋白质附加物；在病毒颗粒中的单链 DNA（称做正链）通过一个双链复制型（RF）DNA 进行复制。双链复制型 DNA 包含“+”和“-”链，正像  $\phi$ X174 中一样。只有正链被包装到新的病毒颗粒中。每一代约产生 1,000 个子代 M13。M13 的一个引人注目的特点是它不杀死宿主细菌。结果，大量的 M13 可以生长，而且很易收获（从 10 升培养液可得到 1 克）。可用一个限制性酶在一个单一位点切开环状双链 RF 型 DNA，以便克隆。用同样的限制性酶切出的双链外源 DNA 片段可连接到被切过的 RF 型上，（图 Ⅲ-6-18）。外源 DNA 插入 RF 可以有两种不同的方向，因为两个 DNA 分子的末端都是一样的。因此一半包装到病毒中去的新正链含有外源 DNA 的一条链，另一半则含有外源 DNA 的另一条链。一个单一的病毒颗粒感染 *E. coli* 将产生大量单链 M13DNA，它含有外源 DNA 的同一条链。邻近于插入 DNA 部位的 M13 顺序是已知的，因为它是限制性酶切的专一部位。因而，合成一个具有互补顺序的寡聚核苷酸可以作为引物，进行任何插入 DNA 的双脱氧法顺序分析。M13 是顺序分析的理想载体，但是不适合



到这些片段的末端,形成粘性末端。然后这些片段被插入载体,如 $\lambda$ 噬菌体 DNA 中。噬菌体 DNA 是制备成具有同样粘性末端的。在体外把 DNA 包装入病毒颗粒,以选择含有插入的大片段的重组 DNA 分子。用这些重组噬菌体感染大肠杆菌。最后的溶胞产物含有人 DNA 片段,这些片段储存在许多病毒颗粒中。这就组成了一个**基因组库**,因为他们含有全部人基因组片段。噬菌体可以无限期地繁殖,所以,这个基因库可以重复应用很长时期。

然后对这个基因组基因库进行筛选,以寻找那比例很小的、容纳有所研究的基因的噬菌体。计算表明,如要成功率大于 99%,那么就需要筛选 500,000 个克隆;因此快速和有效的筛选过程是非常重要的。这可以由 DNA 杂交来完成。

把重组 DNA 悬液稀释,并铺在长满细菌的平皿上(前图 31-25)。当每一个噬菌体颗粒落在并感染了一个细菌时,在平皿上就会长出一个噬菌斑。然后用硝酸纤维素膜复印这个“主”平皿。感染的细胞和从溶胞中释放出来的噬菌体 DNA 粘到膜上,按照噬菌斑的式样形成斑点。在膜上的完整细菌用 NaOH 溶解,同时碱还可以使 DNA 变性。这样,用 $^{32}\text{P}$  标记的探针,就可以和膜上的 DNA 杂交。**用放射性互补 DNA 或 RNA 作为探针,可以检测出膜上单一点中所存在的特殊的 DNA 顺序。**放射自显影可以显出含有重组 DNA 的斑点的位置。从完整的主平皿上挑出相应的噬菌斑,并繁殖。一个研究者一天就可以完成一百万个克隆的筛选。

**只要有探针,这个方法就实际上可以筛选任何基因。如何得到专一的探针呢?一种方法是从富有这种相应基因的细胞中的 mRNA 开始。**例如,红细胞前体含有大量血红蛋白 mRNA,而血浆细胞则富有抗体分子的 mRNA。从这些细胞中得到的 mRNA 可以按大小分开,然后富集我们所研究的 mRNA。正像不久将谈到的,一个互补于这个 mRNA 的 DNA 可以在体外合成和克隆,产生高度专一的探针。

另一方法是,**假如此基因所编码的蛋白质的部分氨基酸顺序是已知的,就可以制备这个基因的探针。**有一个问题就是一个肽的顺序可以被许多寡聚核苷酸所编码。为此目的,含有色氨酸和甲硫氨酸的肽顺序最好。因为这两种氨基酸只有一个密码,而其它氨基酸残基有 4 至 6 个密码。因此就要选择含色氨酸及甲硫氨酸比例高的肽段,例如甚至五肽



就有四种可能的 DNA 编码顺序,因为酪氨酸和半胱氨酸各有两个密码。

所有起编码作用的 DNA 的顺序(或其互补顺序)的混合物都是用固相法合成,并用 $^{32}\text{P}$ -正磷酸磷酸化其 5'端,以进行放射性标记。平皿复制物在这些探针下曝光,用放射自显影鉴定任何带有此互补 DNA 顺序的克隆。在这些克隆子中,含有所希望基因的哪些克隆可以从噬菌斑的重组 DNA 顺序而鉴定,从而确定它是否与所感兴趣的蛋白质的氨基酸顺序相符合。

一个典型的基因组 DNA 库含有约 20kb 长的许多 DNA 片段。我们如何获得有关更长的 DNA,比如说 300kb 长的片段的信息呢?我们记得基因库中哪些片段是许多 DNA 任意切割而来,所以有一些片段是彼此重叠的。假设一个含有 A 区的片段是由与其互补的探针 A'杂交而筛选出来的,而 A'也含有 B 区(图 III-6-21)。一个新探针 B'可以由切断这个片段并次克隆 B 区而获得。如果这个基因库再用探针 B'进行筛选,则可发现含有 B 区的新片段。有一些含有邻近的 C 区。因此我们可以知道包含 A, B, C 的 DNA 片段的信息。这种次克隆和再筛选的过程被称作**染色体的爬行**。长段 DNA 可以用这个方法分析,只要每一个新的探针是与一独一无二的某一区域互补。

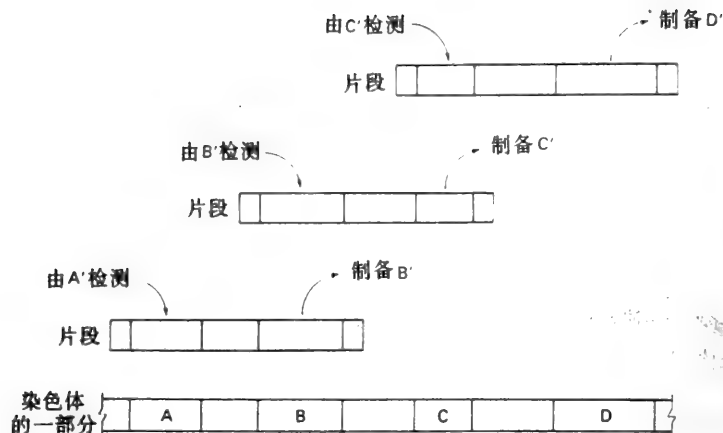


图 Ⅲ-6-21 染色体爬行法。长段未知 DNA 可利用已知的碱基顺序作为起始，用次克隆和再筛选法进行研究。

从 mRNA 制备的互补 DNA (cDNA) 可以在宿主细胞中表达

哺乳类 DNA 可以被 *E. coli* 克隆和表达吗？大多数哺乳类基因是外显子和内含子镶嵌的。

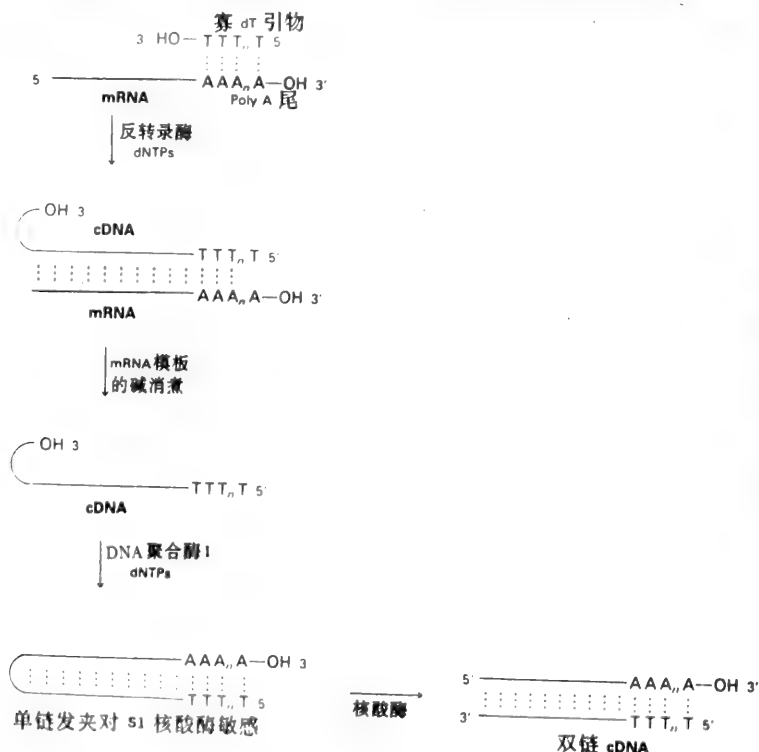


图 Ⅲ-6-23 用反转录酶从 mRNA 形成双链 cDNA。

细菌不能表达这些被打断的基因，因为细菌缺乏使原始转录子去掉内含子的机制。然而可以克服这一困难，只要使细菌取进与 mRNA 互补的 DNA。例如，胰岛素原即胰岛素前体，可用细菌合成，此细菌容纳了含有互补于前胰岛素 mRNA 的 cDNA 质粒（前图 31-26）。当今许多糖尿病患者所用的胰岛素大多来自细菌。

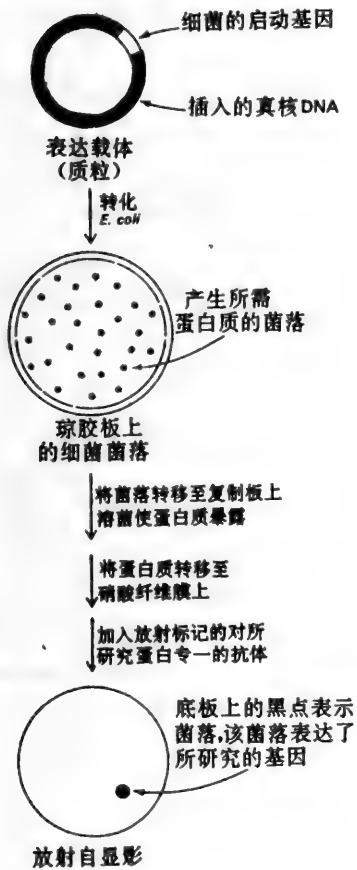


图 3-6-24 用特殊抗体染色法，筛选表达载体产物。

复制皿上的细菌斑，被溶菌使之释放蛋白质。被释放的蛋白质则结合到硝酸纤维素膜上。加上<sup>125</sup>I-标记的抗体，然后放射自显影，显示出主皿上所需要的菌落的位置。只要蛋白质被表达并具备相应的抗体，就可以应用这种免疫化学筛选法。

形成互补 DNA (cDNA) 的关键是反转录酶。如前所述，逆转病毒在复制它们的基因组 RNA 时用此酶形成一 DNA-RNA 杂交链。如果提供一个与 RNA 碱基配对并含有一自由的 3'-羟基的引物，反转录酶就可以合成一条与一 RNA 模板互补的 DNA 链。我们可以利用此酶从 mRNA 合成 DNA，只要提供一个与大多数真核细胞 mRNA 3' 端的 poly-A 顺序配对的寡聚-dT 引物（图 3-6-23），然后在 4 种脱氧核苷三磷酸存在的情况下合成 cDNA 链的其余部分。随后提高 pH，以水解此 RNA-DNA 杂交物中的 RNA 链。与 RNA 不同，DNA 不被碱水解。新合成的 DNA 链的 3'-端然后形成一个发夹环，并以它为引物合成相对的另一条 DNA 链。然后用 S1 核糖核酸酶消化掉，以除去发夹环，S1 酶识别未配对的核苷酸。合成的连接剂可以加到此双螺旋 DNA 上，以与适当的载体相连接。

可将 cDNA 分子插到一种载体中去，这种载体有利于其在宿主细胞（如 *E. coli*）中的高效表达。用作这种载体的质粒或噬菌体叫做表达载体；为了最大限度地转录，需将 cDNA 在靠近一个强的细菌启动子的部位插入载体中去，而且应位于正确的阅读框架之内。此外，这个载体要保证高效翻译，就要为 mRNA 起始密码子附近的核糖体结合部位编码。可以根据它们在细菌中指导外源蛋白质合成的能力来筛选 cDNA 的克隆。对于所研究的蛋白质专一的放射性抗体，可用来鉴定那些容纳相应的 cDNA 载体的细菌菌落（图 3-6-24）。如前所述，在复制

## 插入真核细胞的新基因可以高效表达

细菌是扩增 DNA 分子的理想宿主。它们可以充当生产范围广泛的原核和真核蛋白质的工厂。然而，细菌不能进行翻译后修饰，例如不能专一性切割多肽，不能将碳水化合物单元连接上去，因为它们缺少所需的酶。因此，许多真核细胞基因只能在真核宿主细胞中正确表达。将重组 DNA 分子引入高等有机体的另一个原因，是想深入了解它们的基因是如何组织和

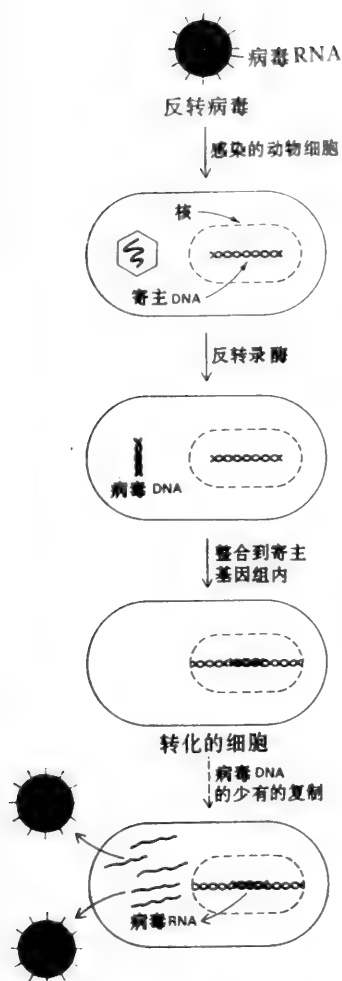


图 Ⅲ-6-26 逆转病毒的生活史。

表达的：在胚胎发育时基因是如何启动和关闭的？一个受精卵是如何发育成一个有机体的，这有机体具有高度分化的细胞，这些细胞在时间上和空间上都是有组织的。现在可以有效地探讨这些生物学上的核心问题了，因为在哺乳类细胞中和在细菌中一样可以表达外源基因了。

可以用几种方法将重组 DNA 分子引入动物细胞中。一种是动物细胞取进由磷酸钙沉淀的外源 DNA 分子。进入的 DNA 的一小部分被稳固地整合入染色体 DNA。用这种方法掺入的效率低，但是由于它容易进行，还是有用的。另外一种方法是将 DNA 注射入细胞。将一个吸有外源 DNA 溶液的细头（0.1 $\mu$ m 直径）玻璃微量吸样器插到细胞核中。一个熟练的研究者每小时可注射数百个细胞。约 2% 被注射的小鼠细胞能存活，并含有新的基因。第三种方法是用病毒携带新基因进入动物细胞。最有效的载体是**逆转病毒**（RNA 肿瘤病毒）（图 Ⅲ-6-26）。如前所述，这些病毒通过 DNA 中间体进行复制，与正常的信息传递相反（因此用字头逆转）。逆转病毒生活史的一个引人注目的特点是由反转录酶的作用所产生的其基因组的双链 DNA 形式会随机地进入宿主细胞的染色体 DNA。病毒基因组的这一 DNA 文本叫做前病毒 DNA，可以有效地被宿主细胞表达，并且和细胞中正常的 DNA 一样被复制（见 34 章）。逆转病毒通常不杀死它们的宿主。用得自 **Maloney murine leukemia** 病毒的载体感染哺乳类细胞可有效地将外源基因引入这种细胞内。这种载体可接受长至 6kb 的插入片段。用这种逆转病毒的载体引入到转化的宿主细胞基因组中的一些基因可高效表达。

遗传工程产生的巨鼠说明外源基因可在哺乳类的细胞中得到表达。**生长激素**（Somatotropin）是 21kd 的蛋白质，通常由脑下垂体合成。缺乏这种激素就产生侏儒病，过多

则导致巨人症。将大白鼠生长激素基因放在质粒中小鼠金属硫基蛋白启动子之后（图 Ⅲ-6-28）。这个启动子通常是在染色体上，控制金属硫基蛋白的转录。金属硫基蛋白富有半胱氨酸，对重金属有高的亲合力。肝脏合成这种保护性蛋白质要靠重金属，如镉的诱导。将几百个拷贝的这种质粒微量注射到小鼠受精卵的雄性原细胞核（pronucleus）中，再将这个受精卵注入到养母小鼠的子宫中去。在由微量注射卵发育而成的许多小鼠中都含有大白鼠的生长激素基因，这可由它们的 DNA 的 Southern 印迹得到证明。这些**转基因**小鼠含有许多大白鼠生长激素基因的拷贝（每个细胞约 30 拷贝），比对照小鼠生长得快得多。在这些小鼠中生长激素水平相当于正常小鼠的 500 倍。成熟的小鼠的体重比正常的高两倍。外源 DNA 已经转录，它的 5 个内含子已正确剪接，形成具有功能的 mRNA。这些实验明显地证明，外源基因在新的启动子控制下可以整合到哺乳类细胞内，并在其中有效地表达。

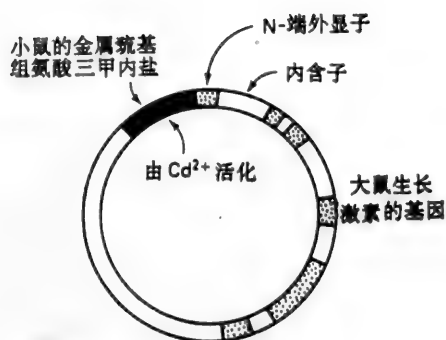


图 III-6-28 大白鼠生长激素基因插入到一个质粒中去，在金属硫基蛋白启动子旁边，这个启动子被重金属（如镉）所活化。

## 用诱导瘤的 (Ti) 质粒携带新基因进入植物细胞

普通土壤细菌致瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感染植物，并向其中引入外源基因 (图 III-6-29)。在感染部位长出一块瘤组织的冠瘿。冠瘿合成冠瘿碱类 (opines)，这是一组氨基酸衍生物，是起感染作用的细菌的代谢产物。实质上是植物细胞的代谢转变为能够满足入侵细菌的十分特殊的代谢。Ti 质粒 (诱导瘤的质粒) 指导合成冠瘿碱类并转向瘤的状态。这种质粒是由农杆菌所携带的。一小部分 Ti 质粒整合到被感染的植物细胞的基因组中去；这个 20kb 的片段叫做 T-DNA (转移 DNA)。

可用 Ti 质粒的衍生物作为载体把外源基因引入植物细胞 (图 III-6-30)。首先用限制性酶和连接酶把外源基因的片段插入到小质粒的 T-DNA 区内。这个合成的质粒被加到农杆菌菌落中，其中容纳天然存在的 Ti 质粒。用重组法形成含有外源基因的 Ti 质粒。这些 Ti 载体极有可能用于探索植物细胞的基因组，并改变植物以改进其农业价值和作物产量。然而他们并不适合于转化所有类型的植物。对双子叶植物 (宽叶植物如葡萄) 及几种单子叶植物可进行 Ti 质粒的转移，但是对具有重要经济价值的禾谷类单子叶植物则否。

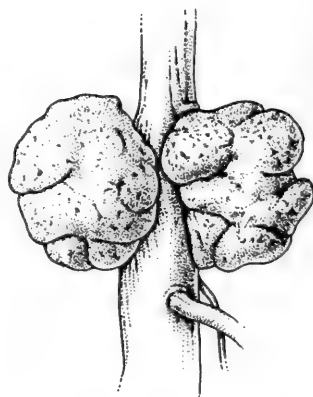


图 III-6-29 冠瘿，一种植物瘤，是由致瘤农杆菌引起的，此细菌含有致瘤的质粒 (Ti 质粒)。

最近施用强电场 (图 III-6-31)，可将外源 DNA 引入禾谷类的单子叶植物，像双子叶植物一样。这种技术叫做电穿孔技术。首先，用纤维素酶除去围绕植物细胞的纤维素壁；这产生原生质体，即质膜裸露的植物细胞。然后把电脉冲施加到原生质体和质粒 DNA 的悬液中。由于强电场使膜在瞬间可让大分子通过，于是质粒 DNA 分子进入细胞；然后让细胞壁重建，其结果产生可存活的植物细胞。曾用这种方法将含有抗抗菌素基因的质粒 DNA 把玉米细胞和胡萝卜

细胞稳定地转化了。而且，这种质粒 DNA 已经在被转化的细胞中有效地表达了。

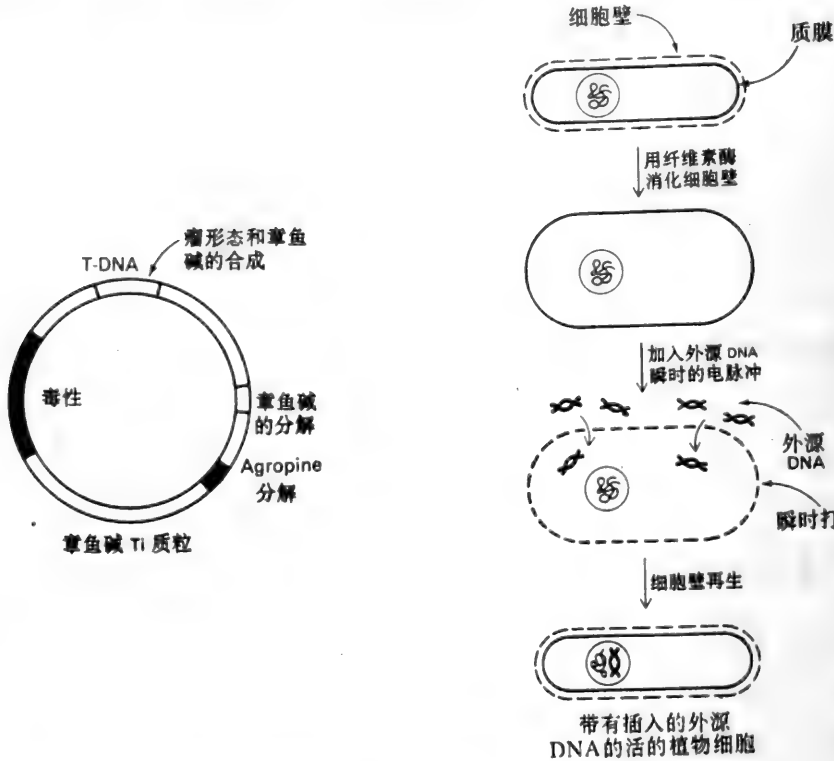


图 Ⅲ-6-30 含有 Ti 质粒的农杆菌可将外源基因引入到一些植物细胞中去。[据 M. Chilton. A vector for new genes into plant. 1983. Scientific American, Inc.]

图 Ⅲ-6-31 可用电穿孔技术将外源 DNA 引入植物细胞，即施加强电场，以使质膜瞬间可通透。

### 用定点突变基因工程产生新蛋白质

从自然界提供的众多基因中用筛选方法，对基因和蛋白质已经了解了很多。用经典的遗传方法是在整个基因组中随机地产生突变，然后选择那些具有特殊表现型的突变。分析这些突变体，然后知道哪些基因发生了变化，而 DNA 测序法则可鉴定变化的准确实质是什么。现在重组 DNA 的方法已使在体外创造特殊突变成为可能。我们可以用 4 种有指导的变化，即**缺失、插入、移位和替换**，来组建具有所设计的性质的新基因。

在两个部位用限制性酶切割质粒，然后重新连接形成一个较小的环形可以产生特异的缺失。这种简单方法常用来移去一大部分 DNA。较小的缺失则可将质粒在单一位点切断而产生。然后用外切酶酶解线性 DNA 的两个末端，于是两条链上的核苷酸都被切去了。再将缩短了 DNA 片段连接成环状，它就缺失了限制性酶切位点处的一小段 DNA。

很容易用寡聚核苷酸**定点突变法**产生单一氨基酸被替换的突变蛋白质。假设我们想要把

一个特定的丝氨酸换成半胱氨酸。假如：(1) 我们有一个含有这个蛋白质的基因或是 cDNA 和 (2) 我们知道欲改造的部位附近的碱基顺序，这种突变就可产生。如果我们所感兴趣的丝氨酸是由 TCT 编码，我们需要把 C 换成 G，以得到由 TGT 编码的半胱氨酸。这种突变的关键是准备一个寡聚核苷酸引物，这引物除了含有 TGT 替代 TCT 外，其余均与基因的这部分互补。这个质粒的两条链被分开，然后这个引物与互补链发生退火（假如退火在适宜温度下进行，那么 15 个碱基中，一个碱基错配是可以容忍的。核酸杂交一个很显著的特点是它的严格性，即配对所需的近似性完全可以靠不同温度和离子强度进行实验控制）。然后由 DNA 聚合酶延伸引物，并由 DNA 连接酶将环形双链连接起来。然后复制双链，产生两种子代质粒。一半具有 TCT 顺序，而另一半具有 TGT 顺序。表达具有新的 TGT 顺序的质粒，就可以产生在单一部位上丝氨酸被半胱氨酸替换的蛋白质。我们将会遇到许多例子，即利用寡聚核苷酸诱导的突变来准确地改变基因的调控部位，去产生特制的蛋白质。

也可用剪接基因片段的方法产生新蛋白质，这些基因片段都是编码在自然界中并不在一起的某些结构域的。例如，一个抗体基因可以连到一个酶的基因上，产生一个嵌合蛋白质，这种蛋白质即用作化疗药剂。而且用固相法可以从头合成完全新的基因。人们很感兴趣的是：利用这些方法来指导合成的疫苗的形成，这种疫苗可能比传统的疫苗安全，后者是由钝化致病的病毒而制得的。

## 重组 DNA 技术开辟了广阔的远景

生命的分子基础的分析由于重组 DNA 技术而发生了革命。复杂的染色体图易于作出了，而且还可将其分解成可以进行操作和辨认的单元。靠克隆扩增基因可提供大量 DNA 进行顺序分析。基因现已成为可以阅读的开卷书了。新的认识的领域不断出现，真核基因中内含子的发现便是一例。现正在富有成效地探索着生物学的中心问题，例如发育的分子基础。基因组的阅读展开了进化的新纪录。生物化学家现在可以在基因和蛋白质两个研究领域间自由自在地走来走去了。

基因和 cDNA 的分析可以发现以前不知道的蛋白质的存在，这些蛋白质可被分离和纯化（图 III-6-34A）。相反，纯化一种蛋白质可以从分离和克隆 cDNA 基因开始（图 III-6-34B）。由于现在发展了微量化学技术和基因克隆的扩增技术，非常小量的蛋白质和核酸就足够了。蛋白质化学、核酸化学、免疫学和分子遗传学的强有力的技术是大力协同的。

可以用特殊的方法改变基因，从而创造新的蛋白质。定位突变打开大门，可以了解蛋白质是如何折叠，如何识别其他分子，如何催化反应和如何加工信息的。可在细菌中进行基因或 cDNA 的克隆和表达，从而获得大量蛋白质。激素（如胰岛素）和抗病毒试剂（如干扰素）正在由细菌生产。将深刻改变医学的新药理学已在形成。重组 DNA 还可以提供高度专一的诊断试剂，如探测基因疾病的 DNA 探针。已用逆转病毒将丢失的基因转入患基因疾病的小鼠，人的基因治疗大概将在不久的将来开始。由于能够重组新的基因，并将其转入真核细胞，在不远的将来农业也几乎肯定会受益。植物基因工程很可能产生这样的植物，它们更加抗旱和更有营养价值。



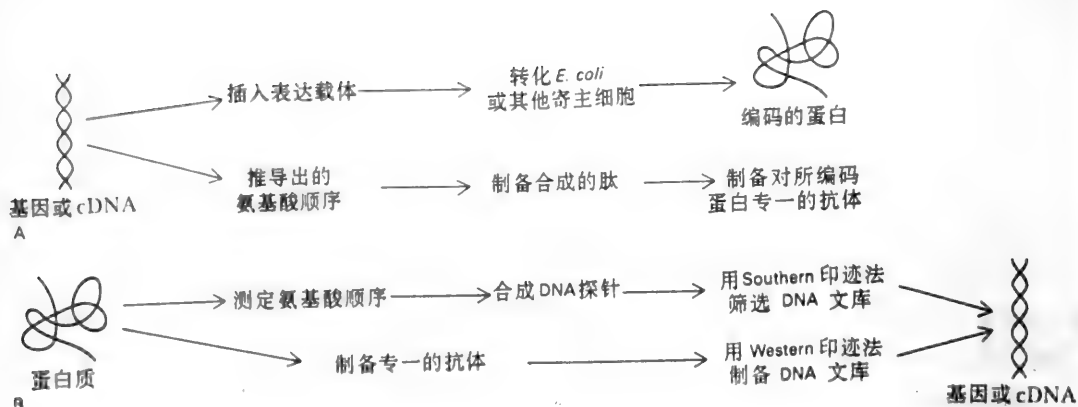


图 III-6-34 蛋白质化学和核酸化学的技术相互增强  
(A) 从 DNA (或 RNA) 到蛋白质; (B) 从蛋白质到 DNA。

## 概 要

引起生物学革命的 DNA 重组是建立在各种作用于核酸的酶的基础之上的。限制性酶是一组关键试剂,它们是内切酶,可以识别双链 DNA 上专一的碱基顺序,而且切割双链中的两条链。限制性酶切开的特异片段可以用电泳分开和显示出来。这些限制性内切酶片段的样式是 DNA 分子的指纹图谱。含有特殊顺序的 DNA 片段,可用一个标记的单链 DNA 探针进行杂交鉴定 (Southern 印迹)。快速顺序分析技术的发展使 DNA 分子的分析前进了。DNA 可以用化学方法在特殊碱基部位切断,以进行顺序分析 (Maxam - Gilbert 方法),或者用控制 DNA 复制的方法 (Sanger 双脱氧法) 进行顺序分析。用任一方法产生的片段可用凝胶电泳将之分开。用  $^{32}\text{P}$  在 5' 端标记并放射自显影,或用荧光标记的方法可以显示出这些片段。靠连续不断地将脱氧核苷 3'-氨基磷酸加到一个连接在不溶的支持物上的生长链上,可以合成杂交用的 DNA 探针或新的基因。100 个核苷酸长的 DNA 链可以很容易地用自动化固相法合成。

在实验室可以组建新的基因组,引入宿主细胞并表达。连接具有粘性末端的 DNA 片段,可以产生新 DNA 分子。这些粘性末端是来自限制性酶的作用。如果 DNA 是一双螺旋链,就可由 DNA 连接酶连接其末端。质粒 (环形的副染色体) 和  $\lambda$  噬菌体可用作细菌中克隆的载体,从酶解的 DNA 可以克隆特异基因。用互补的 DNA 或 RNA 探针可以对基因库进行筛选。或者可以靠逆转录酶从 mRNA 形成 cDNA, cDNA 插入一个含有强启动子的载体中可被细菌有效地表达。用逆转病毒或直接注射,可将外源 DNA 带入哺乳类细胞。巨小鼠的产生就是靠把大白鼠的生长激素注射到小鼠的受精卵中,这表明了哺乳类细胞可按照设计的路子改变遗传性。靠致瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, 包含 Ti, 诱发肿瘤) 质粒,可将新 DNA 带入植物细胞。也可用强电场的方法将 DNA 引入细胞。强的电场可使细胞瞬时让大分子通过。

在体外用产生特异突变的方法工程新的蛋白质。单一氨基酸替换的蛋白质突变体可用一编码新氨基酸的寡聚核苷酸作为引物,进行 DNA 复制而产生。蛋白质和核酸化学技术高度协同,研究者可极方便地在基因和蛋白质两个领域之间来回进行工作。



## 第7章 转运氧的蛋白质： 肌红蛋白和血红蛋白

### 肌红蛋白的中央外显子编码功能性血红素-结合单位

正如在第5章中所讨论的，大多数真核基因是外显子（编码顺序）和内含子（不编码的插在中间的顺序）的镶嵌体。已经指出蛋白质的不连续的结构和功能单位由外显子编码。肌红蛋白恰好说明了这一普遍原理。肌红蛋白的基因由3个外显子组成：一个N-端外显子，编码残基1至30（NA1至B2）；一个中央外显子，编码残基31至105（B3至G6）；一个C-端外显子，编码残基106至153（G7至HC5）。看看天然的肌红蛋白的结构，即可知几乎所有与血红素结合的部位都是由中央外显子编码的。由另外两个外显子编码的区域与血红素没有什么接触。由残基31至105组成的分离的多肽有什么功能特性？现在还不知道这个问题的答案，但另一片段的性质却发人深思。用梭菌蛋白酶，一种对精氨酸专一的蛋白酶，消化脱铁卟啉肌红蛋白（apomyoglobin），即产生一由残基32至139组成的多肽，这个多肽相当于中央外显子和部分C-端外显子。这一片段与血红素结合。而且，这一称为小型肌红蛋白（minimyoglobin）的复合物能够可逆地结合 $O_2$ 和 $CO$ 。结合和解离的速率果真与完整蛋白质的几乎相同。

这些发现表明，小型肌红蛋白的构象与天然肌红蛋白的非常相似。因为氨基末端的外显子和C-末端外显子的最后14个残基都不是可逆的氧合作用所必需的，很显然，中央外显子含有结合血红素和维持氧合蛋白的天然折叠的大部分信息。组成血红蛋白的各条链的外显子-内含子的组织与肌红蛋白的十分相似。因此，这些氧载体的中央外显子是一古老的DNA片段，它在很久很久以前就编码一与血红素结合的功能单位。

### 血红蛋白由4个多肽链组成

（正文略）

·表Ⅲ-7-2 人血红蛋白的亚基

胚胎的血红蛋白	
Hb Gower <sub>1</sub>	$\zeta_2\epsilon_2$
Hb Gower <sub>2</sub>	$\alpha_2\epsilon_2$
Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$
胎儿的血红蛋白	
HbF	$\alpha_2\gamma_2$
成年人的血红蛋白	
HbA	$\alpha_2\beta_2$
HbA <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$

## 胎儿的 DNA 可用以分析镰刀型细胞基因的存在

改变一单个碱基,将 A 变成 T 的结果是使血红蛋白 S 中  $\beta^6$  上的谷氨酸为缬氨酸所代替。利用能够识别这一区域中的顺序的限制性内切酶将 DNA 切断,就可立即检测出这种突变。限制性内切酶 Mst II 的靶子是回文序列 CCTNAGG (其中 N 代表任何一种碱基),这一序列存在于血红蛋白 A 的  $\beta$  链的基因 ( $\beta^A$  基因) 中,而不存在于血红蛋白 S 的基因 ( $\beta^S$ ) 中。由于在  $\beta^S$  基因中没有这一靶子部位,用 Mst II 完全消化就产生一 1.3kb 的片段,这相当于  $\beta^A$  基因中的 1.1kb 片段。经过消化的 DNA 样品中的片段用凝胶电泳分离,并用  $^{32}\text{P}$  标记的探针用 Southern 印迹法检视,探针是与 1.1kb 的顺序互补的。放射自显影即说明在 DNA 样品中究竟是存在  $\beta^A$  基因,还是  $\beta^S$  基因,还是两者都有。

这种限制性内切酶的方法的引人注意的特点,就是 DNA 样品可以来自胎儿的任何细胞。反之,血红蛋白样品只能来自红血球或其前体。从胎儿获得羊水的样品要比获得造血细胞容易得多,也安全得多。在怀孕早期,即妊娠之后 8 周左右所取得的绒毛膜的生检样品,即可用以进行 DNA 分析。这类获得和分析基因组 DNA 的技术是可以普遍采用的。能在怀孕早期用限制性内切酶分解胎儿的 DNA,并随后用高度专一的探针进行 Southern 印迹的技术而能以检测的遗传疾病的数目正在迅速增多。胎儿的忧心忡忡的父母现在可以有根据地作出决定,是否终止妊娠。

## 第9章 酶作用的机理

### 核糖核酸酶 A 水解 RNA 时形成环式磷酸中间物

现在我们来讨论核糖核酸酶 A 的催化作用，这是胰脏所分泌的消化酶。已指出过此酶的折叠和它与尿嘧啶碱的结合。核糖核酸酶 A 已被详细研究了多年，因为它小(124 个残基，13.7kd)、多和稳定。此酶可被枯草杆菌素在单个肽键上切开，产生核糖核酸酶 S，这是一种有催化活性的复合物，由一 S-肽部分(残基 1—20)和一 S-蛋白部分(残基 21—124)组成，这两部分由多个非共价键联在一起。无论是单独的 S-肽还是 S-蛋白均无活力。核糖核酸酶 A 和 S 的催化活性大体相同，因此我们把它们都当作核糖核酸酶。

核糖核酸酶催化 RNA 链中磷酸双酯键的水解。被切断的是磷和 5' 氧原子之间的键。所形成的一个新的末端有一游离的 5'-OH 基因，另一个末端则有一游离的 3'-磷酸基团。核糖核酸酶所催化的水解作用，像在没有酶时碱所催化的水解作用一样，是通过 2',3'-环式磷酸中间

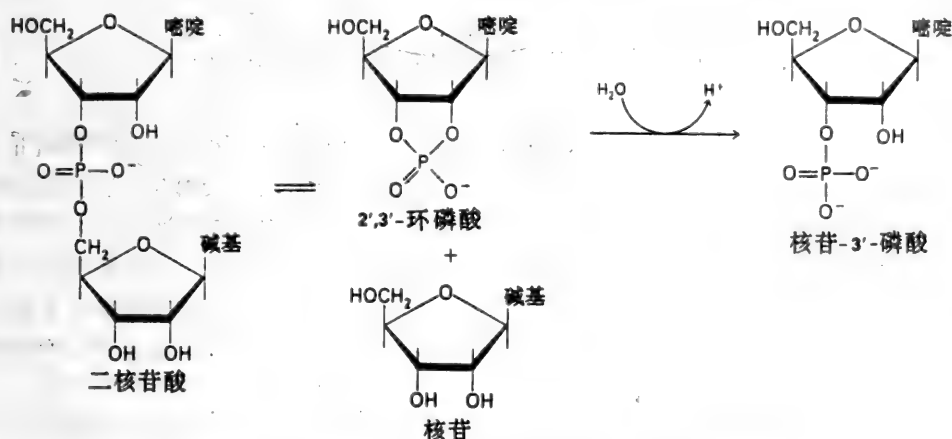


图 9-21 核糖核酸酶水解 RNA 时形成 2',3'-环式磷酸中间物。

物而进行的。在第一阶段，酶切键(scissile bond)被切开，形成一环式磷酸末端和游离的 5'-OH。在第二阶段，水与环式磷酸酯反应产生一游离的 3'-磷酸末端。环式磷酸中间产物的形成是可逆的，而其水解实在是不可逆的。这一环式中间产物易被分离出来，因为它的形成比它的水解快得多。

在酶切键的 3' 侧的核苷酸必须是一个嘧啶，因为嘌呤环太大，不能存在于活性部位而又不使之扭曲。尿嘧啶和胞嘧啶环均通过多个方向准确的氢键而与活性部位结合。与此相反，核糖核酸酶对其 RNA 底物中的所有其他碱基的性质均无选择性，因为此酶与它们的结合基本上是靠静电引力。一系列 9 个带正电荷的赖氨酸和精氨酸侧链与 RNA 的带负电荷的磷酸主

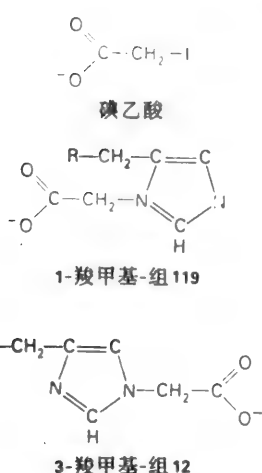


图 Ⅲ-9-22 碘乙酸使核糖核酸酶中的两个组氨酸残基烷基化。产物为 3-羧甲基-组氨酸 12 和 1-羧甲基-组氨酸 119。

链形成盐桥。单链 DNA 也与核糖核酸酶结合，但不会被水解，因为 DNA 没有 2'-羟基，因而不能形成 2',3'-环式中间物。非催化的 DNA 的水解也比 RNA 的慢得多，理由同上。没有 2'-OH 基使得 DNA 成为可靠得多的遗传信息的贮藏所。

在核糖核酸酶的三维结构未被认识以前，根据化学的研究已对其催化机理了解很多。其催化速率对 pH 所作的图是钟形的，像溶菌酶的一样。因为其最适 pH 约为 7，故假定有两个组氨酸残基参与催化作用，一个组氨酸呈碱的形式，另一个呈酸的形式。化学修饰的研究支持这一设想。与烷基化试剂碘乙酸反应，会使组氨酸 119 或组氨酸 12 中的咪唑环被羧甲基化，但不能两个组氨酸都发生反应（图 Ⅲ-9-22）。修饰任何一个组氨酸侧链都会使酶钝化。底物或竞争性抑制剂均保护核糖核酸酶使不被碘乙酸所修饰并钝化。这些发现说明，组氨酸 12 和 119 在活性部位中彼此靠得很近而且在催化环式中间物的形成及其随后的水解时是交替地作为质子供体和受体而起作用的。

## RNA 水解的过渡状态中磷是五共价的

理查德 (F. Richards) 和威科夫 (Harold Wyckoff) 所进行的 X 射线结晶学的研究证明 2 个组氨酸都在活性部位上，与所预料的恰好一致。他们解决了核糖核酸酶与一底物类似物的复合物的三维结构，此类似物为 UpC 的磷酸 (phosphonate) 类似物，此磷酸化合物中亚甲基 ( $-\text{CH}_2-$ ) 代替了酶切键中的氧原子。(磷酸化合物中有  $\text{C}-\text{P}$  键，磷酸酯可作为酯类的不能被水解的类似物。  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{PO}_3^-\text{R}'$  为磷酸酯，  $\text{R}-\text{O}-\text{PO}_3^-\text{R}'$  为磷酸酯。) 这一类似物虽然在空间结构上与 UpC 非常相似，但不能被核糖核酸酶所水解。这种酶-类似物的复合物的分辨率的结构在阐明详细的催化机理方面是极有价值的。

在催化作用中 3 个残基起着关键性的作用：组氨酸 12，组氨酸 119 和赖氨酸 41 (图 Ⅲ-9-24)。反应开始于 2'-O 对酶切键中磷原子的攻击，方式如下：第一，组氨酸 12 的未电离的形式从 2'-OH 上接受一个质子，这促进了这一氧原子的亲核性。同时，组氨酸 119 的质子化的形式开始把它的质子给予 5'-O，而 2'-O 则开始与 P 形成键，磷暂时与 5 个氧原子形成键。这一五共价的过渡状态被附近的带正电荷的赖氨酸 41 的侧链由于静电引力而被稳定化了。当组氨酸 119 上的质子完全转移到这一氧原子上时，P 和 5'-O 之间的键就断开了。同时，在 P 与 2'-O 之间的键完全形成了，于是产生 2',3'-环式中间产物。

反应的第二阶段，这一环式中间产物的水解，差不多是第一阶段的逆转。差别只是水代替了被移去的 5'-O 这一组分。现在组氨酸 12 是质子供体，而组氨酸 119 是质子受体。组氨酸在生理 pH 下既能起酸的作用又能起碱的作用的这种能力说明了它何以在许多酶的活性部位中出现的原因。

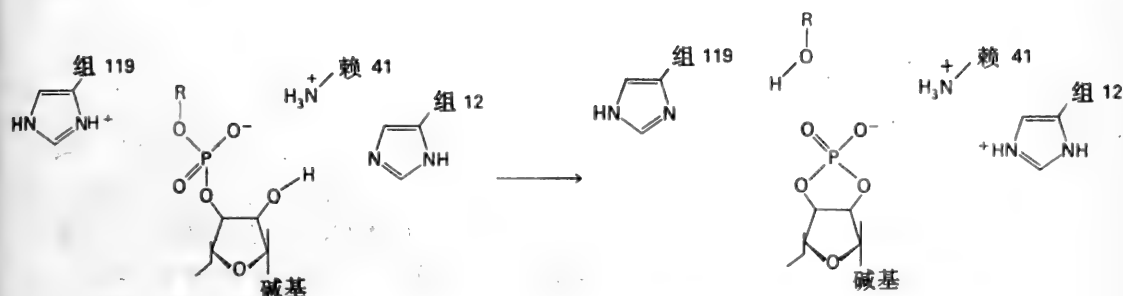


图 Ⅲ-9-24 在核糖核酸酶的催化作用中环式磷酸中间产物形成的可能机理。形成了一五共价的过渡状态。环式磷酸中间产物的水解实质上是此反应的逆转，水代替了 ROH。

五共价过渡状态的几何学是有趣的。当磷变为五共价时，RNA 中磷的四面体几何变成了底贴底的双角锥体 (trigonal bipyramid) 几何形状。磷居于中央，三个氧原子在赤道平面上，另两个则在角锥体的顶上。在形成环式中间产物时，出去的 5'-O 在一个顶上，进来的 2'-O 则在另一个顶上。在这一中间物水解时，水中的 O 在一个顶上，2'-O 则在另一个顶上。在每一阶段，一个顶被一个起攻击作用的亲核物质所占据，另一个顶则被离去中的基团所占据。攻击的和离去的基团的这种几何学称为“成线” (in line)。

## RNA 分子也可能是效力很高的酶

千万种蛋白质已被提纯，并已证明它们有酶促活力。五十多年以来一直相信所有的酶都是蛋白质。但近年来的实验表明，RNA 分子也可能是有高度活性的酶。最为突出的例子就是喜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*)，一种原生动物中的能自动剪接的核糖体 RNA 所释放出来的一个内含子的短链 L19RNA (第 29 章)。塞克 (T. Cech) 发现，L19RNA 以一种高度专一的方式催化寡核苷酸底物的断裂和连结。五胞核苷酸 ( $C_5$ ) 被 L19RNA 转化为较长的和较短的寡聚体。特别是  $C_5$  被降解为  $C_4$  和  $C_3$ ，而同时又形成  $C_6$  和更长的寡聚体。因此，L19RNA 既是核糖核酸酶又是 RNA 聚合酶。

这种 RNA 酶对  $C_6$  的作用比对  $U_6$  的快得多，而对  $A_6$  和  $G_6$  则毫无作用。它遵循米凯利斯-门顿 (Michaelis-Menten) 动力学。对于  $C_5$ ，其  $K_M$  为  $42\mu M$  和  $k_{cat}$  为  $0.033s^{-1}$ 。已发现去氧- $C_5$  为  $C_5$  的竞争性抑制剂， $K_i$  为  $260\mu M$ ，这一发现证明底物中的 2'-OH 是必需的。这样，L19RNA 表现出了经典的酶催化的好几个标志：高度的底物专一性，米-门饱和动力学和对竞争性抑制剂的敏感性。

这种 395 个核苷酸的 RNA 如何能既起核糖核酸酶的作用又起聚合酶的作用呢？其三维结构尚属未知，但对于其催化机理可以作一些推测 (图 Ⅲ-9-27)。五胞核苷酸结合在 L19RNA 的一个特别的部位上。此底物中的 5 个 C-碱基中大概有几个是与此 RNA 酶中富含 G 的顺序发生碱基配对的。结合的  $C_5$  中的第 4 和第 5 个 C 之间的磷酸双酯键然后被此酶的末端 G 残基中的 3'-OH 所攻击。在酶的末端 G 与底物的末端 C 之间形成磷酸二酯键，于是产生一 GpC 共价中间产物。在此转酯作用中  $C_4$  同时被释放出来。这一极其不稳定的新的磷酸

二酯键能被水攻击,释放 pC 并再生此酶。这三个步骤的系列反应说明了 L19 RNA 的核糖核酸酶活性。

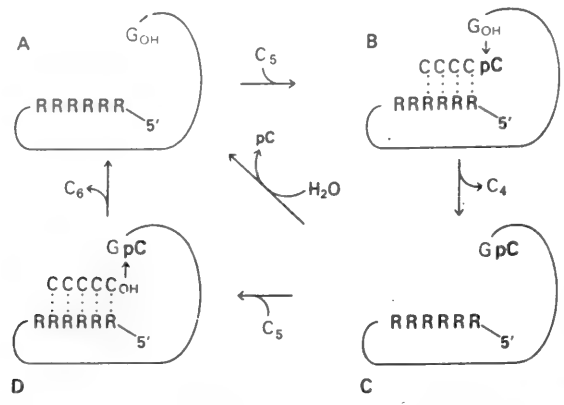


图 Ⅲ-9-27 L19 RNA 可能的催化机理。

(A)单独的酶。(B)C<sub>5</sub>通过氢键与酶结合,末端的 pC 以共价键与酶的末端 G 结合。余下的 C<sub>4</sub>部分可以自由地与酶解离。(C)GpC 的水解使酶恢复到原来的状态。(D)另一方式是,共价结合的 pC 被另一 C<sub>5</sub> 分子攻击,形成 C<sub>6</sub> 形式。[引自 A. J. Zang and T. R. Cech. *Science*, 231(1985):473.]

另一方式是,GpC 酶中间产物与另一 C<sub>5</sub> 分子结合,后者攻击 GpC 而产生 C<sub>6</sub>,并再生该酶。这一步骤说明了 L19 RNA 的聚合酶的作用。因此,共价的中间产物——GpC 既可被 OH<sup>-</sup> 也可被第二个底物的 3'-OH 基团所攻击。高 pH 有利于水解,而高浓度的 C<sub>5</sub> 底物则促进转酯作用而形成 C<sub>6</sub>。通过连续不断的转酯作用,这样形成的 C<sub>6</sub> 可延长至 C<sub>7</sub> 和更长的寡聚体。看来十分可能的是,GpC 的磷酸二酯键的反应性是异乎寻常地高,这是因为它被静电引力所活化而形成了五共价的过渡状态。

这种 RNA 酶的催化效率与蛋白酶的相比又如何呢? L19 RNA 的  $k_{cat}/K_M$  值为  $10^3s^{-1}M^{-1}$ ,比大多数催化活性高的蛋白质的小 5 个数量级。不过,它与核糖核酸酶 A 的类似。由这一 RNA 酶催化的 C<sub>5</sub> 水解的速率大约是无催化的速率的  $10^{10}$  倍。很显然,RNA 分子也像蛋白质一样,可以是非常有效的催化剂。RNA 分子能形成精确的三维结构,它能与专一的底物结合,并使过渡状态稳定化。不过,与蛋白质不同的是,RNA 不能形成大的非极性的活性部分。RNA 类也不像蛋白质类那样多种多样化,因为它们只有 4 种不同的建造元件,而不是 20 种。因此,大多数酶是蛋白质,但必须牢记蛋白质并没有独占催化作用。RNA 酶(有时也称为核酸酶)非常适于识别和转化单链核酸,因为它们与其底物有共同的碱基配对语言。L19 RNA 的酶促活性的发现,即核糖核酸酶——参与 tRNA 前体的加工过程的酶——中 RNA 组分的酶促活性的发现对进化有重要的意义,并且开辟了一个令人鼓舞的新的研究领域。

### 羧肽酶 A 的催化机理

根据许多研究工作所进行的 X 射线和化学的研究,得出了一个关于羧肽酶 A 的似乎合

理的催化机理。假定所产生的 ES 复合物的结构如图 III-9-33 所示。设想 3 个基团是催化作用所必需的：锌离子、精氨酸 127 的胍基和谷氨酸 270 的羧基。酶切键中的羰基碳原子被谷氨酸 270 的羧基所攻击，形成一羧酐中间物，这使得酶切键作好了准备为水所攻击，水分子是结合在  $Zn^{2+}$  上的。高度极化的水分子把一个质子转移给 NH 基，切断了酶切键。另一方式是，活化的水分子可以直接攻击酶切键中的羰基碳原子。

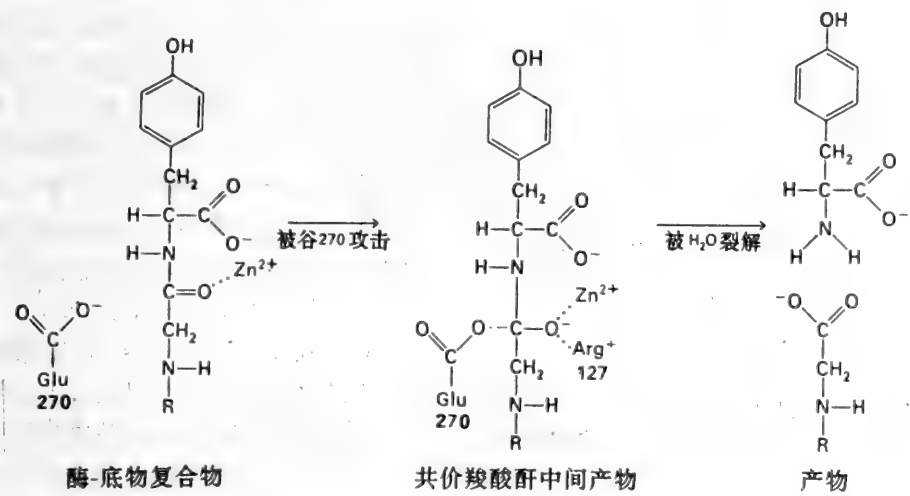


图 III-9-33 羧肽酶的一种可能的催化机理：谷 270 直接攻击酶切键的羰基碳原子而形成共价的混合酐中间物。

### 定位突变是设计并制造新的酶以及阐明其机理的有效方法

在克里斯蒂(A. Christie)所著“东方快车的谋杀者”中，赫丘利·普瓦罗特(Hercule Poirot)作为侦探的任务因众多似是而非的嫌疑犯的存在而变得难以完成了。同样，羧肽酶 A 的催化机理也因活性部位中数个可能的催化基团的存在而难以阐明。例如，曾假定酪氨酸 248 的羟基是在切割步骤对底物的 NH 基的质子供体。卢特(W. Rutter)用定位突变检验了这一假说。假若酪氨酸 248 为催化作用所必需，那么其位置被苯丙氨酸所取代的酶的突变体应该是没有活性的。用寡核苷酸定位的突变把酪氨酸 248 的密码子(TAT)变为苯丙氨酸的密码子(TTT)。含有这一基因的重组质粒被引入到酵母中并在其中表达。令人注目的发现是，突变酶的  $k_{cat}$  值和天然酶的一样，但其  $K_M$  值却达到 6 倍之高。这些结果说明酪氨酸 248 参与底物的结合，但并非催化作用所必需。这一犀利的实验说明，要阐明蛋白质中某一特定基团的功能，定位突变法有多么大的作用。

### 对过渡状态专一的抗体有催化活性

抗体分子专一地与刺激其合成的抗原相结合(第 35 章)。抗体分子的极其多种多样的结

合专一性能被用来产生新的酶吗?我们已经看到,催化作用的实质是由专一的结合的相互作用而使过渡状态稳定化。因此,用过渡状态的类似物作为抗原将有可能产生有催化活性的抗体。在这一方面,令人高兴的开端便是已经制备了有酯酶活性的抗体。

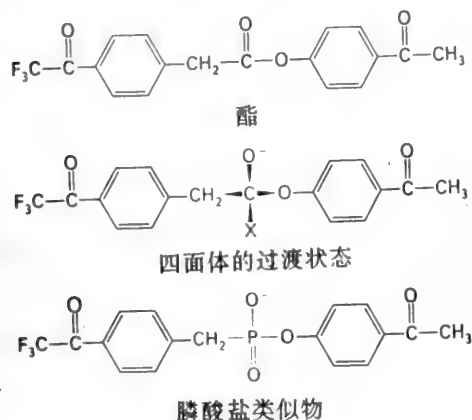


图 II-9-49 用酯的磷酸类似物免疫小鼠引起了催化酯类水解的抗体的形成。这一类似物的几何特点与酯类水解过渡状态的相同。

有可能做到的是制备这样一种抗体,它们能催化天然存在的酶的范围以外的反应。例如,能裂解病毒或对肿瘤专一的蛋白质的抗体在治疗上可能是大有前途的。

预料图 II-9-49 中所示的酯的水解是

由一亲核物质( $\text{X}$ )攻击酯的羰基碳原子而发生的,其结果是形成一四面体的过渡状态。关键是获得专一地与此过渡状态结合的抗体。用这种酯的共价结合的磷酸类似物免疫小鼠。这种稳定的类似物大概与酯水解的过渡状态类似。实际上,对这一磷酸类似物专一的单克隆抗体催化这种酯类的水解。抗体催化的反应速率与溶液中自动水解的速率之比为 1000。这种具有催化性质的抗体遵循米-门动力学,  $K_M$  为  $1.9\mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}$  为  $2.7 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 。  $k_{\text{cat}}/K_M$  之比  $1.4 \times 10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 比那些动力学特性完备的酶小 3 个数量级。由这种抗体所催化的酯的水解能由加入磷酸类似物而被竞争性地抑制,并表现出高度立体专一性。有

## 概 要

(上略)最近发现的 RNA 酶类出乎人们的意料,因为以前一直认为蛋白质在催化作用方面独占鳌头。从一种有鞭毛的原生动物的自我剪接的 RNA 的内含子衍生的一种 RNA 分子居然既有核酸酶的作用,又有 RNA 聚合酶的作用。这种 RNA 性质的酶具有高度的专一性、米-门动力学和对竞争性抑制作用的敏感性。在进化过程中,核酸性质的酶类可能出现于蛋白质性质的酶类之前。

羧肽酶 A 是一种蛋白酶,它所识别的 C-端残基含有芳香族的侧链或一个大的脂肪族侧链;它水解相邻的肽键。底物类似物甘氨酸酯氨酸的结合会在其活性部位上引起结构上的重大变化,即使此部位从一种充满了水的区域变为一个疏水区。羧肽酶说明催化作用中的诱导契合。这种酶的活性部位的令人瞩目的特点就是锌离子,其作用是使酶切键中的羰基碳原子发生极化,因而易于受到亲核攻击。这是诱导底物中的电子应变的一个例子。与羰基碳相邻的谷氨酸残基也在催化作用中起关键性作用。羧肽酶 A 是含锌蛋白酶类中的一个成员。

在胰凝乳蛋白酶和其他丝氨酸蛋白酶中,有高度活性的丝氨酸 195 在催化作用中起着关键性作用。肽底物水解的第一阶段是酰基化作用,即酰基化的酶中间物的形成,在此中间物中底物的羧基组分与丝氨酸 195 的羟基发生酯化作用。组氨酸 57 显著地提高了丝氨酸-OH 的亲核性,当丝氨酸攻击底物的羰基碳时组氨酸 57 从丝氨酸接受一个质子。所形成的带正电荷的组氨酸又由于与带负电荷的天冬氨酸 102 的静电相互作用而稳定化了。丝氨酸、组氨酸



和天冬氨酸形成一个催化性的三位一体,它是所有丝氨酸蛋白酶类的催化作用的核心部位。**四面体过渡状态**上的负电荷也由于与氧阴离子(oxyanion)洞中主链上的两个NH基形成氢键而稳定化了。第二阶段是去酰基化,它实质上是第一阶段的逆转,水代替了氨基组分。胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、几种凝血因子以及其他脊椎动物的丝氨酸蛋白酶大概都起源于一共同的祖先基因。蛋白酶类中的另外两个主要的类别是**巯基蛋白酶类**和**羧基(酸性)蛋白酶类**。

## 第 10 章 酶活性的控制

### ATC 酶及其与双底物类似物 PALA 的复合物的三维结构

李普斯寇姆 (W. Lipscomb) 及其同事曾以 2.6 Å 的分辨率阐明了 ATC 酶的三维结构。ATC 酶即天冬氨酸转甲酰基酶 (aspartate transcarbamoylase)。他们也解决了 ATC 酶与变构抑制剂 CTP 的以及与一种底物类似物的复合物的结构问题。这种酶的设计是独特的。1 个具有催化活性的三聚体 ( $c_3$ ) 在上面, 3 个具有调节作用的二聚体 ( $r_2$ ) 在一赤道面上, 在赤道面之下是另一具有催化活性的三聚体。这种酶有一个很大的居中的洞, 可经由几个通道到达此洞。包括 ATC 酶的球体的直径为 130 Å 左右, 为血红蛋白大小的 2 倍。所以 ATC 酶共由 2 个  $c_3$  部分和 3 个  $c_2$  部分组成, 其一半是  $c_3r_3$ 。所以从上面看去, 便可看到它的一半, 即  $c_3r_3$ 。这样可以看到 3 个完全相同的  $cr$  单位, 彼此的关系是旋转 120 度。每一在外周的  $r$  链上有 2 个结构域, 外边的含有 CTP 的结合部位, 里边的与 2 个有催化作用链相互作用。 $r$  链的内部一半还含有 1 个锌离子, 它起着结构作用, 与 4 个半胱氨酸残基的硫原子配位。

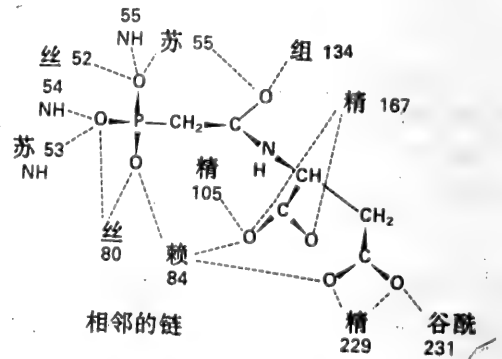
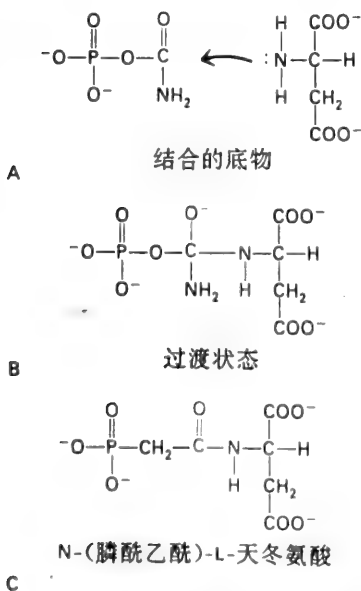


图 10-7 (A) 天冬氨酸的氨基对氨甲酰磷酸的羰基碳原子进行亲核攻击。(B) 过渡状态。(C) PALA 类似于结合的一对底物和过渡状态。

图 10-8 PALA 结合在 ATC 酶催化部位上的方式。在此示意图中未画出所有已形成的静电键和氢键。组氨酸 134 可能使过渡状态中羰基氧原子上的负电荷稳定化。此结合部位在催化链的界面上。Ser80 和 Lys84 是由相邻的催化链贡献的残基。[引自 K. W. Voltz, K. L. Krause, and W. N. Lipscomb, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 136 (1986): 823.]

活性部位在哪里呢? 在形成 N-氨甲酰天冬氨酸时, 氨甲酰磷酸首先通过多个静电引力和氢键的相互作用而结合上去。然后天冬氨酸结合上去, 其氨基则攻击氨甲酰磷酸的羰基碳(图 III-10-7A)。很可能是形成了一个四面体的中间状态(图 III-10-7B)。N-(膦乙酰基)-L-天冬氨酸(PALA)(图 III-10-7C)是此酶的抑制剂, 它与二底物的复合物及过渡状态相似。PALA 与 ATC 酶紧密结合, 解离常数约为 10nM。这种不发生反应的双底物类似物(bisubstrate analog)已被证明在 ATC 酶的研究中是有价值的。含有 PALA 的 ATC 酶的 X 射线分析证明 6 个活性部位中的每一个都是位于催化链之间的界面附近的。由于 PALA 带有很强的负电荷, 它以静电引力与活性部位中的 4 个精氨酸和 1 个赖氨酸结合(图 III-10-8)。它也通过许多个氢键与酶结合。由属于 2 条催化链的残基形成作用部位。特别是一条链的丝氨酸和赖氨酸残基与相邻的链中的许多个残基形成一个结合 PALA 的口袋。

组氨酸 134 的咪唑侧链与 PALA 的羰基氧原子之间的氢键也是值得注意的。当天冬氨酸的氨基攻击羰基碳原子时, 氨甲酰磷酸的羰基氧原子就变成带负电荷的了。组氨酸 134 的质子化的形式能够使四面体的过渡状态中这一带负电荷的原子稳定化。

### ATC 酶中变构的相互作用是由四级结构中大的变化而转达的

超离心的研究表明, 与底物的结合导致 ATC 酶的沉降系数减少 3%。这一发现指明 ATC 酶与底物结合后就膨胀了。未与底物结合的 ATC 酶及其与 PALA 的复合物的 X 射线研究揭示出: 伴随着与此双底物类似物的结合, 四级结构中发生了大的变化。有催化作用的三聚体移开了 12Å, 并旋转了 10 度。此外, 每一起调节作用的二聚体围绕其双重轴旋转了 15 度。PALA 的结合也导致每一条催化链的三级结构的重要变化。有几个环移动位置, 一个赖氨酸残基和一个丝氨酸残基从相邻的催化链中被拉到每一个活性部位中来。在这一变构转变中, c<sub>3</sub> 中的催化链被拉得彼此靠近了, 这使它们能形成最优化的活性部位。

ATC 酶中变构相互作用的空间范围有多大? 在同一 c<sub>3</sub> 中活性部位相距 22Å。每一调节亚基的外面一半中的 CTP 结合部位距最近的活性部位 60Å。因此, 底物的协同结合和 CTP 的反馈抑制是通过长距离而传递的。实际上, 信息是从一个 c<sub>3</sub> 单位的活性部位传递到其他 c<sub>3</sub> 部位的活性部位。用四硝基甲烷与 ATC 酶反应(图 III-10-11), 以在其每一条催化链中形成一有色的硝基酪氨酸基团。在每一催化部位上的一个必需的赖氨酸基团也被修饰, 以阻断它与底物的结合。然后将这一已被修饰的酶的起催化作用的三聚体与天然的三聚体组合在一起, 形成杂交的酶。底物与天然的 c<sub>3</sub> 的起作用的活性部位结合后, 这一杂交分子中另一 c<sub>3</sub> 单位中的硝基酪氨酸的吸收光谱发生了变化。这种交叉组合实验表明: 由于与底物结合而产生的四级结构的变化会导致远处的催化链的三级结构的变化。同样, CTP 和 ATP 引起硝基酪氨酸基团吸收光谱的显著但相反的变化。

关于 ATC 酶的当前工作集中在两个有争论的问题上: 底物、ATP 和 CTP 的结合如何引起

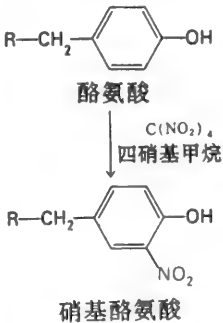


图 III-10-11 酪氨酸的硝化形成一有色的硝基酪氨酸基团。

四级结构中大的变化?反之,催化部位的结合亲和力又如何因四级结构的转换而发生变化?当前的关键是阐明构象变化在距离远的部位间传递的精确途径。ATC 酶的有配体的与无配体的形式的三维结构提供了大量的结构方面的信息,在回答这些问题方面,这些信息是有价值的。已经清楚的是,正如在血红蛋白中那样,在 ATC 酶中传递变构效应方面,不同多肽链之间的界面作为分子开关而起着关键的作用。

## 底物结合在 ATC 酶上引起高度协同的变构转变

哪一模型能够最好地说明 ATC 酶的变构特性呢?协同模型与顺序模型 (sequential model) 不同,它假设变构的转变是发生在整个分子上的,而不是局限在带有配体的特定亚基中。特别是,根据协同模型推测,R 状态中的催化链的部分 ( $f_R$ ) 应大于含有结合态底物的部分 (Y)。曾用光谱法检测琥珀酸与 ATC 酶的结合,琥珀酸是天冬氨酸的类似物。结果由 T 到 R 的转变是由沉降系数的降低控制的,而这种降低则起因于酶的膨胀。得到了有决定意义的结果:当加入琥珀酸时, $f_R$  的改变引起 Y 的改变,正如根据协同模型所推测的那样。

关于变构转变的性质,更多的根据来自于抑制剂效应的研究。如前所述,PALA 是一种效力高的抑制剂,因为它很像 ATC 酶的两个底物并占据活性部位。可是,低浓度的 PALA 由于促进底物的结合而提高反应速度。抑制剂的这种促进作用在 ATC 酶所催化的由砷酸盐分解 N-氨甲酰磷酸反应中特别显著,这是一个非生理的反应。加入 PALA 时,反应速度增加直到平均有 3 个 PALA 结合到一个酶分子上为止。这一最高速度比不加 PALA 时大 17 倍。在对每个酶多加 3 个 PALA 分子以填满催化中心时,反应速度即降至零左右。这种作图的初始斜率说明一个结合的 PALA 就改动了 ATC 酶中的所有 6 个催化部位的构象。5 个未被 PALA 占据的部位被转变成了 R 状态,对底物的亲和力高。因此,ATC 酶中底物调节的变构转变 (homotropic allosteric transition) 完全是协同的,正如莫诺德-钱格斯-魏曼 (Monod - Changeux - Wyman) 模型所预测的那样。

氧对血红蛋白的协同结合也与协同模型非常吻合。事实上,大多数变构蛋白中的底物调节效应最好是用协同模型来说明。与此相反,非底物调节的效应 (heterotropic effect) 则通常用顺序模型说明较好。在 ATC 酶中,底物调节的和非底物调节的效应大概是由不同的变构转变所传递的。需要假定有两个以上的状态来说明许多变构过程的复杂性。

## $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶的不足引起肺气肿

$\alpha_1$ -抗胰蛋白酶 (亦称  $\alpha_1$ -抗蛋白酶) 是一 53kd 的血浆蛋白,它保护组织使免受弹性蛋白酶的消化,弹性蛋白酶是已吞噬了细菌的白血球的分泌产物。对于这种抑制剂,抗弹性蛋白酶应该是一个更为准确的名称,因为它抑制弹性蛋白酶的效力比抑制胰蛋白酶的为高。像胰脏中的胰蛋白酶抑制剂一样, $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶所以抑制靶子酶是因为它几乎不可逆地结合在酶的活性部位上。引起  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶缺乏的遗传疾病证明这种抑制剂在生理上是重要的。例如,在类型 Z 的突变体中用赖氨酸取代 53 位上的谷氨酸残基就会减慢肝细胞对这种抑制剂的分泌。在有这种缺陷的纯合子的个体中,血浆中这种抑制剂的水平约为正常的 15%。其结果是无限过量的弹性蛋白酶消化了弹性纤维和其他结缔组织蛋白,从而破坏了肺泡的壁。

由此而产生的临床上的疾病即称为肺气肿。患有肺气肿的人需要进行深得多的呼吸才能交换同样体积的空气，因为他们的肺泡比正常的弹性小。吸烟显著地增加这种可能性，即 Z 型的杂合子将发展肺气肿。理由是烟氧化了抑制甲硫氨酸 358 (甲硫氨酸  $R-CH_2-CH_2-S-CH_3$  被氧化为甲硫氨酸亚砷  $R-CH_2-CH_2-SO-CH_3$ )，这一残基是结合弹性蛋白酶所必需的。实际上，抑制剂的这一甲硫氨酸侧链就是有选择地捕获弹性蛋白酶的诱饵。反之，氧化产物**甲硫氨酸亚砷**并不能引诱弹性蛋白酶，仅仅将一个氧原子插入到一个蛋白质中就产生这样惊人的结果。

## 用重组 DNA 技术产生的抗血友病因子有疗效

在经典的血友病中，内途径的因子Ⅷ (抗血友病因子) 是没有的或活性非常低的。Ⅷ刺激 X 被 IX<sub>a</sub> 活化为 X<sub>a</sub>，IX<sub>a</sub> 是在这一级联中的另一种丝氨酸蛋白酶。Ⅷ的基因最近被克隆了。这个项目开始于从 25,000 升牛血中提纯数毫克蛋白质，由于Ⅷ在血浆中的浓度低 (低于 0.05 μg/ml)，所以必须进行这一艰苦的劳动。从这一 330kd 蛋白质得到的几个肽的氨基酸顺序已被测定；然后就可以合成一组 DNA 探针，并且从人的基因文库中分离出了因子Ⅷ的基因。曾经让大鼠 (hamster) 细胞将此 186kb 的基因掺入其基因组中，随后这种细胞就分泌出大量人的因子Ⅷ。

过去治疗血友病的办法是输入含有Ⅷ的浓缩的血浆部分，这种疗法昂贵，并且有被病毒感染危险，这些病毒包括肝炎、爱滋病和其它病毒。在最近的将来，用重组 DNA 技术产生的纯化的因子Ⅷ将可能代替这种浓缩的血浆来治疗血友病。这类基因克隆研究的另一益处就是现在可以用 DNA 探针来诊断胎儿有无血友病 (如第 7 章所述关于镰刀形红细胞贫血症的一样)。这些探针还揭示出经典的血友病是由于因子Ⅷ的基因中发生了许多种错义的和链终止的突变。

## 凝血酶可逆地被抗凝血酶Ⅲ所抑制

很明显，凝血过程必须被精细地调节。在出血和血栓形成之间有细微的界线。凝血必须迅速发生，然而又只能限于受伤的范围之内。通常把血块的形成限制在受伤部位的机理是什么？凝血因子的不稳定性对血凝作用的控制有很大贡献。活化的凝血因子寿命短，因为它们被血流所稀释，被肝脏运走，被蛋白酶分解。例如，有刺激作用的蛋白 V<sub>a</sub> 和Ⅷ<sub>a</sub> 就为蛋白质 C 所消化，蛋白质 C 是一种蛋白酶，它是由凝血酶开动起来的。这样，凝血酶除催化纤维蛋白的形成外，还引发凝血级联反应的钝化。

在终止凝血作用方面凝血因子的专一的抑制剂也是关键性的。最重要的一种就是**抗凝血酶Ⅲ**，一种血浆蛋白，它与凝血酶形成可逆的复合物，从而抑制之。抗凝血酶Ⅲ与 α<sub>1</sub>-抗胰蛋白酶相像，不过它对凝血酶的抑制比后者对弹性蛋白酶的抑制强得多。抗凝血酶Ⅲ也阻断凝血级联反应中的其他丝氨酸蛋白酶，即Ⅺ<sub>a</sub>、Ⅺ<sub>a</sub>、IX<sub>a</sub> 和 X<sub>a</sub>。抗凝血酶Ⅲ的抑制作用为**肝素**所促进，肝素是带负电荷的多糖，存在于靠近血管壁的肥大细胞中和内表皮细胞的表面上。肝素的作用是抗凝血剂，它促进抗凝血酶Ⅲ与丝氨酸蛋白酶凝血因子之间不可逆复合物的形成速率。抗胰蛋白酶和抗凝血酶都属于丝氨酸蛋白酶抑制剂类 (serpins)。

血液中的凝血酶和抗凝血酶的量是精确地平衡的，这才得以迅速凝血，并使之局限在伤害处。在一名死于出血不止的 14 岁男孩体内这种精细的平衡被破坏了，因为他的  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶发生了突变，此酶通常是抑制弹性蛋白酶的。在结合弹性蛋白酶的口袋中，甲硫氨酸 358 被精氨酸所代替。这种一单个氨基酸残基的改变强烈地改变了这种起抑制作用的蛋白质的专一性。由于精氨酸 358 的取代，它变成了抗凝血酶。结果，他的凝血酶活性降低了。通常在受伤后  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶活性显著增加，以抵消因受伤害刺激而出现的过量的弹性蛋白酶。在这类悲剧之一中，这个病人的凝血酶降到如此低的水平，以致出现了致命的出血现象。我们在这里看到了一个突出的例子，说明蛋白质中一单个残基的改变如何惊人地改变了专一性，这大概是在进化过程中发生过多次的现象。这一出血的疾病进一步说明具有正确量的蛋白质抑制剂是极端重要的。

### 血纤维蛋白凝块为血纤维蛋白溶酶所溶化

凝块不是永久性结构。相反，给它们的设计是当被破坏区域的结构完整性已恢复后，它们就被溶解。血纤维蛋白被血纤维蛋白溶酶所裂解，此酶是一种丝氨酸蛋白酶，它在三链连结棒区域水解肽键。我们现在可以明白血纤维蛋白为什么有多孔性质了。在这类分子簇中单体单位仅仅通过球状区域相互作用，这使得其余部分的结构是敞开的。血纤维蛋白溶酶分子就能通过水的通道而扩散，以切断能达到的连结棒。

血纤维蛋白溶酶是由其无活性的前体**血纤维蛋白溶酶元**经蛋白酶活化而形成的。这一转变是由组织类型的血纤维蛋白酶元活化剂 (TPA, tissue-type plasminogen activator) 所进行的。这是一种 72kd 的蛋白质，由几种类型的结构域组成，这些结构域也存在于其他蛋白质中。它们是：1 个指纹单位 (finger module, 存在于粘连蛋白中，第 11 章)，1 个生长因子单位 (存在于促进细胞增殖的蛋白质中，第 38 章)，2 个环套 (kringle) 单位 (有 3 个二硫键的单位，形如老式的斯堪的那维亚式蛋糕) 和 1 个丝氨酸蛋白酶单位。环套单位将 TPA 结合在血纤维蛋白凝块上，并在该处将吸附在上面的血纤维蛋白溶酶元活化。游离的血纤维蛋白溶酶元则与此相反，它被 TPA 活化得极慢。TPA 的基因已被克隆，并在培养的哺乳动物细胞中表达。现在可以得到由重组 DNA 技术产生的大量的具有完全活性的 TPA。临床试验证明，在冠状动脉中形成凝块后一小时内，静脉注射 TPA 可显著增加救活猝发心脏病病人的可能性。

## 第 11 章 结缔组织蛋白

### 胶原的基本结构单位由三种链组成

(上略) 译者按: 表 III-11-1 与表 9-1 有 3 处不同: (1) 类型 III 还存在于网膜纤维中; (2) 类型 IV 的组成为  $\alpha_1(\text{IV})_2 \alpha_2(\text{IV})$ ; (3) 增加一类型 V,  $\alpha_1(\text{V})_2 \alpha_2(\text{V})$ , 分布于胎盘和皮肤中。

### 甘氨酸是关键性的, 因为它小

(上略) 近年来对一种 DNA 的分析证明胶原中一个甘氨酸的突变就可能是致死的, 这种 DNA 来自于一个受骨形成不完全病折磨的婴儿, 这种病是因为缺乏类型 I 胶原而引起的结缔组织疾病。由于这种疾病的患者的大部分骨骼是脆的, 故有许多折断处, 因而骨骼变形。这种婴儿有胶原的  $\alpha(\text{I})$  链的正常的等位基因和另一突变的等位基因。DNA 的顺序测定表明有一个核苷酸是不同的。G 为 T 所取代, 于是残基 988 由甘氨酸变为半胱氨酸。这变化破坏了靠近其羧基末端的三重螺旋, 将其暴露在外, 发生了过分的羟基化和糖基化。结果, 这种不正常的胶原在体温下就部分地伸展开了, 不能形成高度有序的原纤维簇。而且, 产生它们的细胞对不正常链的分泌也被损坏了。我们在这里又看到了一个突出的例子, 在  $3 \times 10^9$  个碱基对的基因组内一个核苷酸的改变何以能产生致命的疾病。

这一突变等位基因之所以有破坏作用, 是因为它为一异常的链编码, 而这条链又成为一种三链结构的一部分。用经典的遗传学术语来说, 它是显性的, 而正常等位基因是隐性的。假设形成了等量的正常的和突变的  $\alpha \text{I}$  链, 而且它们彼此间的亲和力是正常的, 那么四分之三的原胶原 (procollagen) 分子就会被破坏, 因为原胶原 (I) 含有两个  $\alpha(\text{I})$  链。导致  $\alpha \text{I}$  链完全无用的突变等位基因害处较小, 因为所产生的胶原将是正常的, 不过量较少而已。内包的突变 (included mutation) —— 产生异常情况的突变, 而且所产生的蛋白质还将成为较大结构的一部分 —— 通常比排除在外的突变 (excluded mutation) 更为有害, 因为后者的基因产物不存在, 或者是破坏到不能与其正常的伴侣形成复合物的程度。内包的突变通常以显性而遗传。

### 粘连蛋白, 一种细胞表面的蛋白质, 使得 细胞能与胞外基质相互作用

细胞通过粘连蛋白而与胶原和胞外基质的其他组分相互作用, 粘连蛋白是能够与质膜的外表面可逆地结合的蛋白质。粘连蛋白 (fibronectin) 意为粘着性的细胞表面的蛋白质, 其英文字来源于两个拉丁字根: fibra (纤维) 和 nectere (结合或连接)。粘连蛋白由两条 250kd 的

多肽链组成，它们被靠近其羧基末端的二硫键联结起来。这一非常长的蛋白质（长 600 Å，宽 25 Å）有一系列排成一条线的结构域，每一结构域能够专一地与细胞外的某种分子结合。例如，氨基末端和羧基末端这两个结构域就对血纤维蛋白有很高的亲和力。当然，粘连蛋白被掺入到血液中，并通过因子 XIII 转酰氨基酶而与血纤维蛋白交联。此转酰氨基酶是催化血凝作用级联反应的最后一步的（第 10 章）。修补受伤部位的成纤维细胞和其他细胞是通过与凝块中粘连蛋白分子的结合区域的相互作用而粘附在凝块上的。

粘连蛋白也使得发育中的胚胎的细胞能够移动。粘连蛋白的与细胞结合的区域结合并释放整合蛋白（integrin），这是一种跨越质膜的一种蛋白质的复合体。同一粘连蛋白分子的其他结构域结合和释放胶原纤维。因此，细胞吸附在胞外基质上，而且实际上是沿着胶原的轨道而移动。结合肝素的结构域使得细胞能够与蛋白聚糖的葡糖胺聚糖（glycosaminoglycan）组分结合。一个有趣的发现是恶性细胞缺乏粘连蛋白，这可能部分地解释其无限制的侵略性。海带糖蛋白（laminin）是胞外基质中的另一种粘性糖蛋白。它使得上皮细胞能与下面的结缔组织连接。尤其是，它对类型 IV 胶原的亲和力高，这种胶原是底层膜的一个组分。海带糖蛋白是一种非常大的由 3 条链组成的蛋白质（~1000kd），呈十字形。海带糖蛋白和粘连蛋白一样，也是由各有明确结合功能的多个结构域组成的。

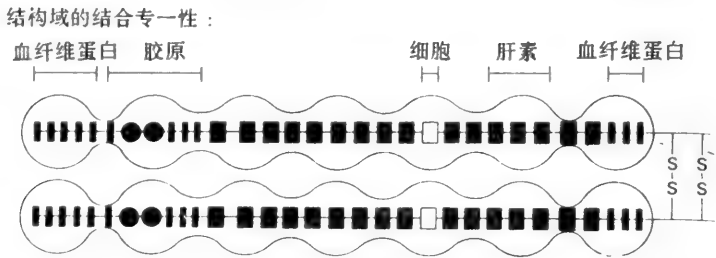


图 11-33 粘连蛋白由具有部分重复的氨基酸顺序的结构域组成。类型 I 的单位为有阴影的长方形，类型 II 的单位为圆形，类型 III 的单位为全黑的方形。结合细胞所必需的区域为空的方形。有阴影的方形所代表的单位功能尚不明。这些单位中的每一个都是由一个外显子编码的。（引自 R. Hynes, Fibronectin, 1986, by Scientific American, Inc.）。

粘连蛋白的基因含有 50 个以上的外显子。差不多所有这些外显子都是由 3 种单位变化而成的。在此蛋白质中，在氨基末端与血纤维蛋白结合的结构域由 5 个重复的类型 I 单位组成；而与胶原结合的结构域，则由 3 个这种单位和两个类型 II 单位组成（图 11-33）。类型 III 的单位存在于几个结构域中。在与细胞结合的结构域中类型 III 的单位含有这样一个顺序：精-甘-天冬-丝，它与整合蛋白中一互补部位结合。血浆中的粘连蛋白是肝细胞的产物，其中没有类型 III 的单位，可是在结缔组织中结合在成纤维细胞上的粘连蛋白中却有此单位。这些极其相近的粘连蛋白是由不同的基因编码的吗？答案是否定的。一种新生的 RNA 转录本通过不同方式的剪接即产生多种形式的粘连蛋白（图 11-34）。我们在这里看到一个清楚不过的例子，说明不同的剪接方式如何产生一大类相互有关的、因特定组织的需要而异的不同蛋白质。



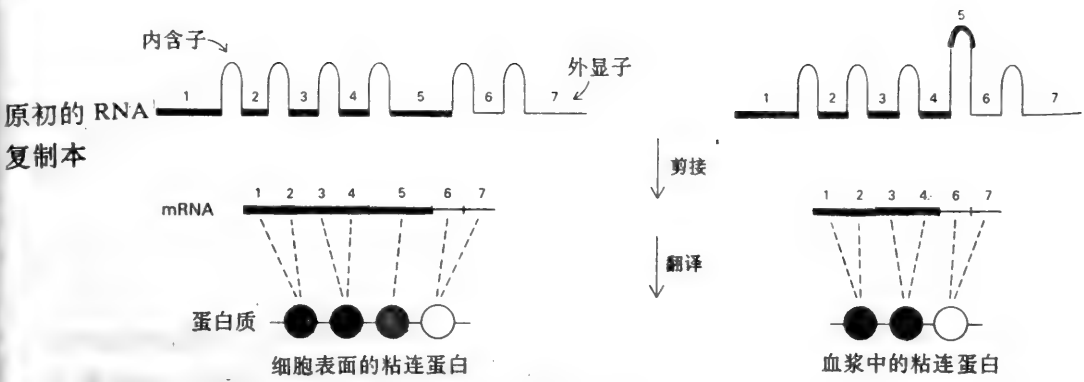


图 11-34 一种 RNA 转录本的不同剪接方式产生不同形式的粘连蛋白。

### 概 要

(上略) 粘连蛋白是细胞表面的一种非常长的蛋白质，它使得细胞能够与胞外的衬质相互作用。粘连蛋白的每一个结构域均能专一地与细胞外的某种分子结合，例如血纤维蛋白、胶原和肝素都是这种分子。此外，粘连蛋白还有与细胞结合的结构域。这些结构域是由三种类型的重复顺序所组成的，每一类型为一个外显子所编码。另外方式的剪接产生各种各样的粘连蛋白。对于发育中细胞的移动和对于伤口的愈合，这种细胞表面的蛋白质是重要的。

## 第12章 生物膜引论

### 功能膜系统可用提纯的组分重组

膜表面上的蛋白质可因变更 pH 和盐浓度而从膜上除去。在这种除去表面蛋白的制品中加入去污剂，即可使膜中的蛋白解除它们彼此之间和它们与膜脂之间的相互作用。理想的去

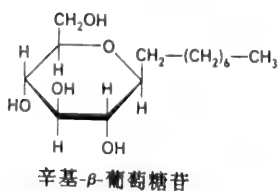
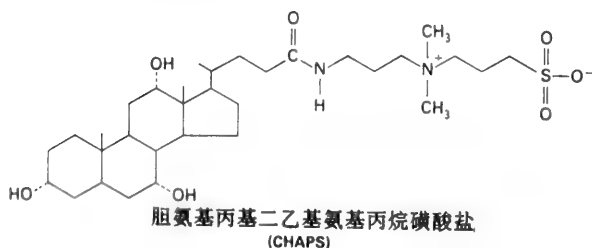
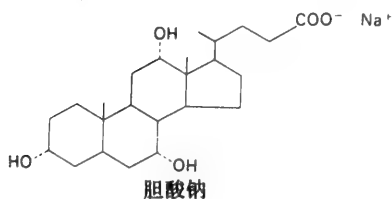
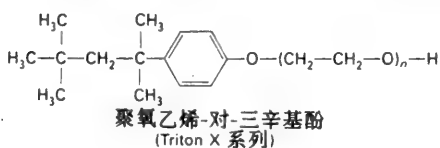
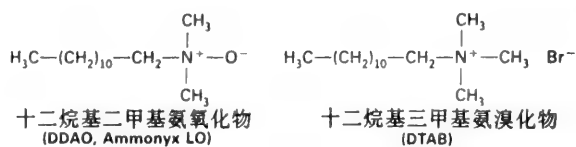


图 12-32 用于溶化和提纯膜中的蛋白质的去污剂的结构。

污剂有 3 个特性：(1) 它应该使所研究的蛋白质与其他膜组分解离；(2) 它不应使蛋白质张开；(3) 它应在提纯完成后极易被除去。性质居间的就是最好的。例如，十二烷基硫酸钠在使蛋白质与其他膜组分解离方面是高效的，但它使蛋白质变性而且难以除掉。可用较温和的去污剂，如胆酸钠和辛基葡萄糖苷（图 III-12-32）。提纯膜蛋白和重建膜之前的步骤是试验一系列的去污剂，以决定那一种最适用于完成特定的任务。

加入过量的去污剂，使得没有一个以上的蛋白质分子存在于去污剂微团中。然后用层析法或沉降法把这一蛋白质、磷脂和去污剂混合物中的组分分开，和用于提纯水溶性蛋白质的方法一样。例如，当使用非离子型（例如 Triton X-100）或兼性离子型（如 DDAO）去污剂时，离子交换层析法有效。（参看图 III-12-32）。有些在去污剂溶液中的提纯的膜蛋白仍有功能活性。例如，视紫质、视网膜杆细胞中的光受体蛋白在去污剂中和在视网膜中的 500nm 吸收是一样的。其次，这种受体蛋白的辅基在两种环境下在照光时均发生同样的结构变化。肌集钙蛋白是肌肉的肌浆网中结合钙的蛋白质，它被溶化在去污剂溶液中时仍保留其结合离子的特性。

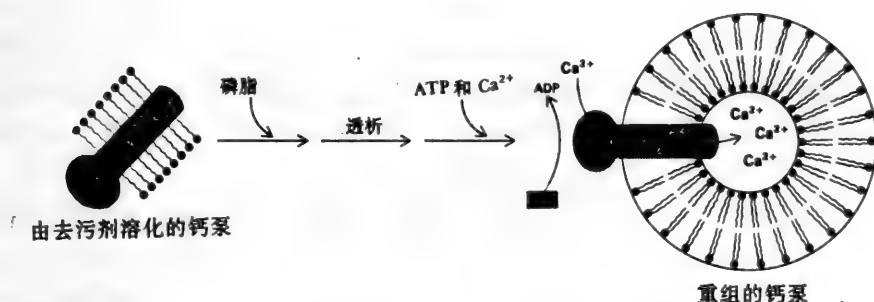


图 III-12-34 提纯的钙泵蛋白 ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶) 保留其转运活性。

不过，膜蛋白的某些最重要的特性只有在膜中才能表现出来。例如，膜通道的活性只有在完整膜中才能检测出来。同样，只有当所研究的蛋白质位于把两个区域分开的膜中时，才能测量出跨膜电压或 pH 梯度的效应来。膜蛋白的这些**矢量特性** (vectorial property) 是它们所以在生物学上重要的关键所在，只有当它们位于膜中时，这些特性才能表现出来。因此，研究膜蛋白的第二阶段就是要把它们放回双分子层中去（图 III-12-34）。向去污剂溶液中的提纯的蛋白质加入合成的磷脂并透析以去掉去污剂，就可完成这一步。在透析过程中当去污剂的浓度减低时，自然就会形成含有蛋白质的磷脂囊泡。这种重组膜与天然膜之间的重要差别就是重组囊泡中的蛋白质通常取向是随机的。不过，将底物和离子只加在膜的一侧即可测出有方向性的功能来。例如，含有钙泵蛋白（称为  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶）的囊泡，如果将能源 ATP 和  $\text{Ca}^{2+}$  加于外面，其内部的水相中就积累  $\text{Ca}^{2+}$ （图 III-12-34）。正如在 37 和 39 章中将要详细讨论的，用提纯的组分重组有功能活性的膜系统是阐明膜过程的强有力的实验探讨途径。

### 红细胞膜含有各种外周蛋白和内插蛋白

由于红血球易于得到而且简单，故被选为研究膜的对象。它们没有细胞器，因而只有一

$$\xrightarrow{\text{希夫试剂}} \text{R}-\text{CH}=\text{N}-\text{染料} + \text{染料}-\text{N}=\text{CHR}'$$

现在已经知道大部分主要的膜周围蛋白是什么蛋白质以及他们的功能了。条带 1 和 2 是**红膜肽 (spectrin)**的二聚体和单体,是一种形成丝的丝状网的蛋白质。即将讨论到,红膜肽与其他蛋白质相互作用,以使红细胞膜**稳定,并调节其形状**。条带 4.1 有助于红膜肽的丝连在膜上。条带 5 是肌动蛋白,是在肌肉收缩和细胞运动中的关键性蛋白质。条带 6 是甘油醛 3-磷酸脱氢酶,它参与经由糖的分解而产生代谢能的过程。

与这些膜周围蛋白不同，条带 3 和所有对 PAS 显阳性的 4 个条带，只有用去污剂或有机溶剂才能使之从红细胞膜上解离下来。因此它们是膜本体蛋白 (integral membrane protein)。冰冻撕裂电镜技术进一步证实了这种推断。这种技术证明，红细胞中的有些膜蛋白是深深地埋藏在膜的碳氢链区域中的。条带 3 的蛋白质组成阴离子通道，它使得重碳酸根能与氯离子相互交换，以缓冲红细胞的 pH。PAS 条带是各种形式的血型糖蛋白，一大类富含碳水化物的蛋白质。

血型糖蛋白 A 是一种其上连有 16 个寡糖单位的单个的多肽链。事实上, 血型糖蛋白中 60% 的质量是糖类, 因此得名 (血型糖蛋白英文为 glycophorin, 出自希腊文, 意即“携带糖”)。血型糖蛋白中有大量的糖类, 正是它所以被 PAS 试剂染色很深的缘故。PAS-1 这一条带是血型糖蛋白 A 的二聚体, 是由非共价的相互作用联在一起的, 这种相互作用不能为十二烷基硫酸钠所破坏。

766

细胞膜的细胞质一侧。疏水的跨膜区是 $\alpha$ -螺旋。

血型糖蛋白 A 含有约 100 个糖残基, 排列在 16 个单位内。其中 15 个连在丝氨酸或苏氨酸的羟基上 (O-连接的), 其中一个连在天冬酰胺侧链的酰胺  $\text{NH}_2$  上 (N-连接的)。这些糖单位富含唾液酸, 一种带负电荷的糖。血型糖蛋白给予红细胞一非常亲水的、阴离子型的外壳。虽然关于血型糖蛋白的结构和拓扑学所知甚多, 但其功能却是一个问题, 尤其是因为发现了缺乏血型糖蛋白 A 的个体仍是健康的。

根据氨基酸顺序可以准确地预测跨膜螺旋

表 III-12-2 鉴定跨膜螺旋的极性标度

氨基酸残基	转移自由能(千卡/摩尔)
苯 丙	3.7
甲 硫	3.4
异 亮	3.1
亮	2.8
缬	2.6
半 胱	2.0
色	1.9
丙	1.6
苏	1.2
甘	1.0
丝	0.6
脯	-0.2
酪	-0.7
组	-3.0
谷 酰	-4.1
天 酰	-4.8
谷	-8.2
赖	-8.8
天 冬	-9.2
精	-12.3

注: 自由能是指把  $\alpha$ -螺旋中的氨基酸残基从膜内 (假定其介电常数为 2) 转移至水中的自由能变化。根据 D. M. Engelman, T. A. Steitz, and A. Goldman. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15 (1986): 330

血型糖蛋白中有一 19 个残基组成的非极性极高的顺序, 这一事实首次说明蛋白质的这一段跨越脂类双分子层并折叠成  $\alpha$ -螺旋。合成的多肽的研究证明  $\alpha$ -螺旋在非极性介质中比在水中稳定, 水与主链上的 NH 和 CO 基团竞相争夺形成氢键。确定跨膜螺旋的办法之一是询问某一假设的螺旋片段是优先选择在碳氢环境中, 还是在水中。特别是我们想计算当一螺旋片段从膜内被转入水中时的自由能变化。表 III-12-2 为氨基酸残基的估计值。例如, 将多聚 L-精氨酸螺旋从膜内转移至水中是极为顺利的 (螺旋中每个精氨酸为 -12.3 千卡/摩尔), 而将多聚 L-苯丙氨酸螺旋如此转移则是十分不顺利的 (螺旋中每个苯丙氨酸为 +3.7 千卡/摩尔)。

膜中的碳氢链核心典型的宽 30 Å, 由 20 个残基组成的  $\alpha$ -螺旋可以跨越。我们可以选定一种蛋白质的氨基酸顺序, 并计算把一段假想的 1 至 20 残基的  $\alpha$ -螺旋从膜内转入水中的自由能变化。对于 2 至 21、3 至 22 等等残基均可如此计算, 直至顺序终了为止。选来进行计算的 20 个连续的残基称为窗口。对于血型糖蛋白 A, 把自由能变化对窗口中的第一个残基的位置所作出的图表明, 当残基 70 为窗口中的第一个残基时, 有一清楚的最大值 +40 千卡/摩尔 (图 III-12-37)。

这种水测法图 (hydropathy plot) 正确地鉴定出血型糖蛋白跨膜  $\alpha$ -螺旋。一般而论, 以 20 个残基的窗口为基础所作出的水测法图中, +20 千卡/摩尔或更高的峰就表示该多肽段可能是跨膜的  $\alpha$ -螺旋。根据这一标准, 血型糖蛋白只有一个跨膜的螺旋, 这与实验结果是一致的。实际上, 水测法图正确地预测出了一种光合作用中心蛋白的 11 个跨膜螺旋。不过应该注意到,

水测法图中的高峰并不证明该肽段就是跨膜的螺旋。甚至可溶性蛋白质也可能有非极性如此高的区域。反之，某些膜蛋白中有中极两性的跨膜螺旋而水测法图不能检测出来。不过，清楚的是水测法作图在提示膜蛋白如何折叠方面是有价值的，并且会引出检验这类模型的实验来。

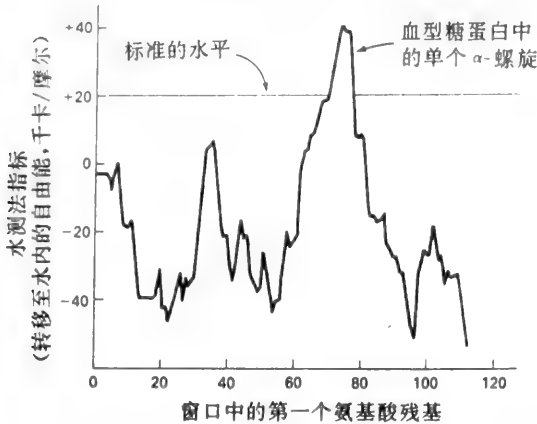


图 12-37 血型糖蛋白的水测法图。将 20 个残基的螺旋由膜中转移至水中的自由能变化为纵轴，以蛋白顺序中此螺旋中第一个残的位置为横轴所作的图。水测法图中大于 20 千卡/摩尔的高峰即表示可能为跨膜螺旋（文献同表 12-2）。

### 从几种跨膜的 $\alpha$ -螺旋形成阴离子通道

红细胞膜含有一阴离子通道，它在血液转运  $\text{CO}_2$  和在缓冲红细胞的 pH 方面都起着关键作用。进入组织毛细血管中的红细胞中的二氧化碳在碳酸酐酶的作用下转变为碳酸  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (图 12-38)，然后碳酸离解为  $\text{H}^+$  和  $\text{HCO}_3^-$ 。释放出的质子被去氧血红蛋白吸收，这是波尔

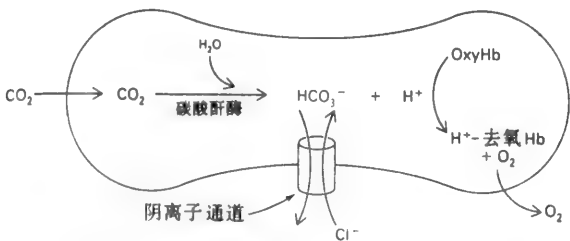
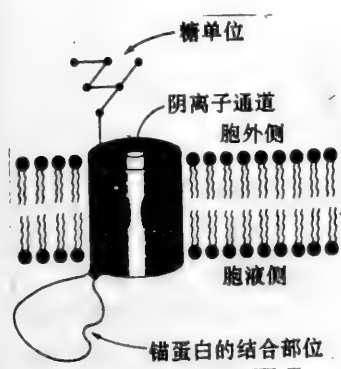


图 12-38 红血球中的阴离子通道在转运  $\text{CO}_2$  方面起重要作用，此作用是通过  $\text{HCO}_3^-$  被  $\text{Cl}^-$  交换而实现的。

效应的一部分。重碳酸根则通过阴离子通道离开红细胞，与  $\text{Cl}^-$  交换。在肺循环中，这一过程逆转过来。阴离子通道（亦称区带 3 蛋白或阴离子交换器）非常多，约占全部膜蛋白的三分

之一。每一红细胞含有这种膜本体蛋白大约  $10^6$  个拷贝，它是 929 个残基的单链 (106kd)。



图Ⅲ-12-39 红血球的阴离子通道的结构域构造的示意图。氨基末端结构域与锚蛋白结合，锚蛋白则与红膜肽结合。羧基末端结构域含有一糖单位，阴离子交换的孔则通过膜。

完整的红细胞、内容已渗漏的血影细胞和内面翻成外面的囊泡被蛋白酶消化的结果，都证明阴离子通道跨过红细胞膜，并且这种蛋白的所有分子都指向同一方向。和其他膜本体的糖蛋白一样，其糖单位均位于膜的外侧。此蛋白由两个结构域组成，可用蛋白酶裂解法将它们分开（图Ⅲ-12-39）。此蛋白的 cDNA 的克隆和顺序分析提供更多的有价值的信息。比较亲水的**氨基末端结构域**（420 个残基）位于膜的细胞溶质一侧。它含有与锚蛋白和与几种细胞溶质蛋白结合的部位，锚蛋白是把质膜与其紧下面的膜骨架相结合的蛋白质。去掉这些氨基末端的结构域对阴离子交换活性无影响。**羧基末端结构域**（509 个残基）为重碳酸根与氯离子交换的执行者。它跨过双分子层，正如对通道蛋白所预料的一样。实际上，水测法作图证明此结构域可能含有多达 12 个跨膜的  $\alpha$ -螺旋。由这一通道所进行的阴离子交换的机理将在第 37 章中讨论。

### 红膜肽形成一膜骨架，从而使红血球能耐受强的切变力

红血球是暴露在强大的切变力作用之下的，并且在其 120 天的一生中形状发生着很大的变化。在此期间它旅行约 300 英里，很多时候要通过狭窄的小道。红血球膜的机械的稳定性和弹性来源于质膜和它紧下面的称为**膜骨架**的网状结构相的密切合作。这一下部结构的主要组分是**红膜肽**（spectrin），它是由 260kd 的  $\alpha$ -链和 225kd 的  $\beta$ -链组成的。氨基酸和 cDNA 的顺序分析已阐明每一红膜肽链由许多 106 个残基的单位的重复顺序组成，此单位折叠成 3 条链在一起的卷曲的  $\alpha$ -螺旋。这两条链平行地排列着并互相卷曲形成一柔韧的棒状，长约 1000 Å (100nm)。两个这种  $\alpha\beta$  单位头尾相连形成一四聚体，长 200nm。

红膜肽并不直接与质膜结合，而是通过**锚蛋白**和**蛋白质 4.1**（条带 4.1 蛋白）在不同的部位与质膜结合。锚蛋白在红膜肽的  $\beta$ -链与阴离子通道的氨基末端胞浆结构域之间形成交联（图Ⅲ-12-42）。蛋白质 4.1 是由两条差不多完全一样的链组成的，它促进肌动蛋白纤维丝与两个红膜肽链的羧基末端部分相结合。蛋白质 4.1 还把这一红膜肽-肌动蛋白复合物与血型糖蛋白的胞浆一面连接起来。有些红膜肽的四聚体插在每个蛋白质 4.1 的接头复合物处，形成一在质膜紧下面的网状结构。只有当一种特殊的磷脂，磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸连结在这一膜本体蛋白之上时，蛋白质 4.1 才与血型糖蛋白结合。这一发现说明，红膜肽网状结构与质膜的连结是由此磷脂的浓度所控制的。事实上，磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸在许多种细胞中均参与信号的转换（第 38 章）。

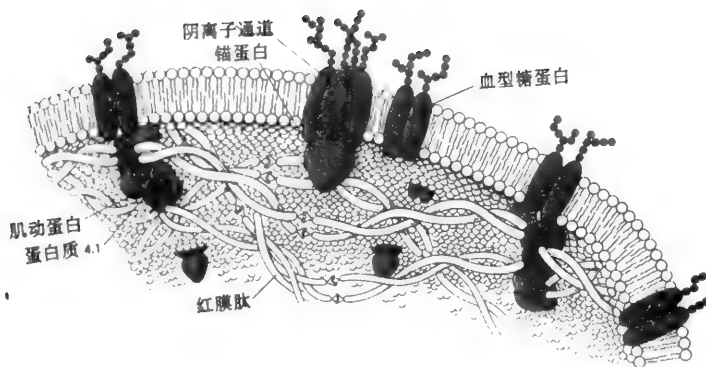


图 12-42 红血球膜骨架与质膜结合的可能方式示意图。红膜肽通过锚蛋白连在阴离子通道上，又通过蛋白质 4.1 连在血型糖蛋白上。蛋白质 4.1 还与肌动蛋白的丝相结合。[根据 S. B. Shoet and S. E. Lux. *Hosp. Pract.* 19 (Nov. 1984): 90.]

在小鼠的一种遗传疾病中红膜肽的重要性是极为明显的，此疾病的结果是溶血性贫血。这些纯合的小鼠的红血球是球形的，而不是双凹面的。它们极为脆弱，自然就会以小囊泡的形式失掉一部分质膜。这些 sph (spherocytic, 球形红细胞的) 小鼠只有约 5% 正常量的红膜肽。向 sph 红血球中引入正常的红膜肽就可治愈这种疾病。在引起红血球异常和降低其机械稳定性的遗传病的病人中，已发现红膜肽、蛋白质 4.1 和膜骨架其它组分的缺失。

红血球膜骨架的另一有趣的方面就是其它组织中有类似的蛋白质。上皮细胞中的 fodrin 与红膜肽非常类似。突触蛋白-1 (synapsin-1) 是一种曾被认为是神经元中所特有的蛋白质，它与蛋白 4.1 是同源的。肌动蛋白是可收缩的组装体中的一个组分，它存在于差不多所有的真核细胞中。十分可能，像红血球中由红膜肽所形成的膜骨架这样的结构在改变和维持许多种细胞的形状方面起着关键性作用。

### 结晶的膜蛋白的电镜和 X 射线分析非常解决问题

(上略) 紫色细菌 (*Rhodospseudomonas viridis*) 的光合作用中心已从去污剂溶液中被结晶出来，其结构已用 3 Å 分辨率的 X 射线分析解决了。这项由戴森霍费尔 (J. Deisenhofer)，米歇尔 (Hartmut Michel) 和休伯尔 (R. Huber) 所进行的划时代的研究提供了关于能量转换的膜组装的十分详细而又内容丰富的印象。其次，这项研究表明，膜蛋白也像水溶性蛋白一样，能形成高度有序的三维晶体，并可用高分辨率的 X 射线分析进行研究。150kd 的作用中心由 4 种多肽键组成，其中 3 条链是跨膜的。跨膜的肽段是  $\alpha$ -螺旋，像细菌视红素一样。作用中心的功能是把光转变成电荷分离，此过程是由 12 个辅基和一个铁原子完成的。当我们讨论光合作用的原初能量转换步骤时，将回过头来再研究这种令人注目的组装体。



第 13 章 代谢：基本概念和设计

核磁共振波谱法能揭示完整生物体内的代谢事件

一个世纪以前，赫胥黎（Thomas Huxley）说道：“假若物理学和化学能够为生理学家提供一种能够弄清楚活的组织的分子结构的方法，就像光谱学能够使研究工作者深入了解天体的本质那样，那将引起生物学中多么大的革命啊。”近年来在核磁共振（NMR）波谱学方面的进展正在使这一希望成为现实。现在已经能够用 NMR 方法研究整体生物的骨骼肌、心脏和大脑的代谢过程，而不伤害生物体。这种技术的根据是这一事实，即某些原子核，例如天然存在的磷的同位素（<sup>31</sup>P），是原来就有磁性的（表Ⅲ-13-4）。当有一外磁场时，它们的磁距可以在两种取向中选择任何一个。这两种状态之间能量之差与外加磁场的强度成正比。其磁距与外磁场的一致状态取这两种能量中稍低的一种，因此稍多一点（在典型实验中约为1.00001的数量级）。当原子核吸收一合适频率的电磁辐射时就会从较低的状态转变为较高的状态。分离的核的这种共振频率  $\nu_0$  为

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

式中  $B_0$  为静止磁场的强度， $\gamma$  对一给定核为一常数（称为磁回旋比）。例如，<sup>31</sup>P 的共振频率在 100 千高斯（10 万高斯）磁场中为 172 兆赫（MHz），这是在光谱中无线电波区域内。将所吸收的能量对频率作图将表现出在 172MHz 处有一高峰。

表Ⅲ-13-4 有 NMR 信号的生物学上重要的原子核

核	天然丰度(元素重量的%)
<sup>1</sup> H	99.984
<sup>2</sup> H	0.016
<sup>13</sup> C	1.108
<sup>14</sup> N	99.635
<sup>15</sup> N	0.365
<sup>17</sup> O	0.037
<sup>23</sup> Na	100.0
<sup>25</sup> Mg	10.05
<sup>31</sup> P	100.0
<sup>35</sup> Cl	75.4
<sup>39</sup> K	93.1

NMR 是一种能提供大量信息的技术，因为对于样品中的全部核来说，局部的磁场与外加的磁场  $B_0$  是不完全相等的。围绕核的键和其他原子的特定排列会或多或少地屏蔽该核使不受外磁场的全部影响。其结果，在不同化学环境中的核会吸收共振频率稍有不同的能量，这种效应称为化学位移。这些差异以相对于标准化合物的分数（百万分之几，ppm）表示。例如，磷原子在  $H_2PO_4^-$  和  $HPO_4^{2-}$  中的化学位移相差 2.4 ppm。不过，在正磷酸盐的溶液中只观察到一个高峰，因为  $H_2PO_4^-$  和  $HPO_4^{2-}$  迅速相互转变。但高峰的位置却因这两种离子

的比值而异，因此它可作为细胞内 pH 的指示剂。

可以比较运动前后人的前臂肌肉的 $^{31}\text{P}$  NMR 波谱。从一复杂的器官得到的是惊人地简单的波谱,只有 5 个高峰是清楚的。其中 3 个主要来自于 ATP 的  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  磷原子。另 2 个峰来自于磷酸肌酸和正磷酸盐中的磷原子。ADP 和其他磷酸化合物对于此波谱没有贡献,因为它们以低得多的浓度而存在,或者不能自由转动。与蛋白质牢固结合的核苷酸中的磷原子以及磷脂双分子层和核酸中的磷原子都是旋转缓慢的,它们有非常宽的谱线,因而会提高这种 NMR 波谱的本底但不呈分散的高峰。经过 19 分钟的运动后所观察到的波谱表明,磷酸肌酸的量明显降低,而正磷酸盐的量明显增高。与此相反,ATP 水平几乎维持不变。这项研究提供了有关细胞内的 pH 和磷酸基由磷酸肌酸流向 ATP 的宝贵的定量资料。在以后的几章中,我们将了解 NMR 波谱是如何应用于深入了解控制机理和代谢紊乱的。NMR 把生物化学、生理学和临床医学更加结合起来了。

## 第15章 糖 酵 解

### 由裂解和异构化形成甘油醛 3-磷酸

(正文略) 图Ⅲ-15-6 的说明如下: 三碳糖磷酸异构化酶由中央核心(由 8 条平行的  $\beta$ -链组成)和围绕着它的 8 个  $\alpha$ -螺旋组成。 $\beta$ -链与  $\alpha$ -螺旋之间有连结的肽段。这种结构单位称为  $\alpha\beta$  桶 ( $\alpha\beta$  barrel), 在丙酮酸激酶中这也是一个结构域 (图略)。

### 果糖和半乳糖进入糖酵解

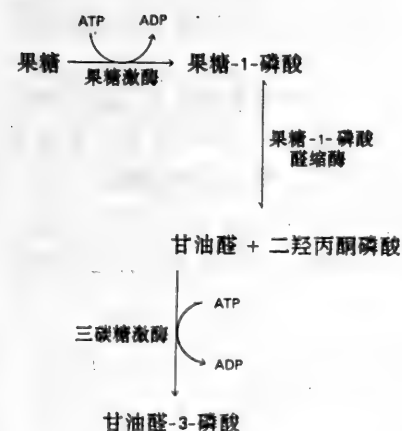
现在我们来研究另外两种很多的糖——果糖和半乳糖是如何参与糖酵解的。回忆一下, 蔗糖水解产生果糖和葡萄糖, 乳糖水解产生半乳糖和葡萄糖。果糖本身存在于许多食品 (如蜂蜜) 中。典型的日摄入量为 100 克。大部分是由肝脏利用果糖-1-磷酸途径 (图Ⅲ-15-8) 代谢的。第一步是果糖被果糖激酶磷酸化为果糖-1-磷酸。然后果糖-1-磷酸被裂解为甘油醛和二羟丙酮磷酸。这种醛醇分解是由专一的果糖-1-磷酸醛缩酶所催化的。然后甘油醛被三碳糖激酶磷酸化为甘油醛-3-磷酸, 因而它也能进入糖酵解。

另一方式是果糖能由己糖激酶磷酸化为果糖-6-

磷酸。不过, 己糖激酶对葡萄糖的亲合力是它对葡萄糖的 20 倍。在肝脏中很少形成果糖-6-磷酸, 因为其中葡萄糖水平很高。相反, 脂肪组织中果糖比葡萄糖多得多。因此, 果糖-6-磷酸的形成所受到的竞争性抑制程度很低, 脂肪组织中的大部分果糖均通过果糖-6-磷酸而被代谢。

半乳糖通过 4 个步骤转变为葡萄糖-6-磷酸。半乳糖-葡萄糖相互转变途径中的第一个反应是半乳糖由半乳糖激酶磷酸化为半乳糖-1-磷酸。

半乳糖 + ATP  $\longrightarrow$  半乳糖-1-磷酸 + ADP + H<sup>+</sup>  
半乳糖-1-磷酸然后由尿核苷二磷酸葡萄糖 (UDP-葡萄糖) 获得一尿苷酸基, UDP 葡萄糖是合成糖苷键的中间产物。此反应由半乳糖-1-磷酸尿苷酸基转



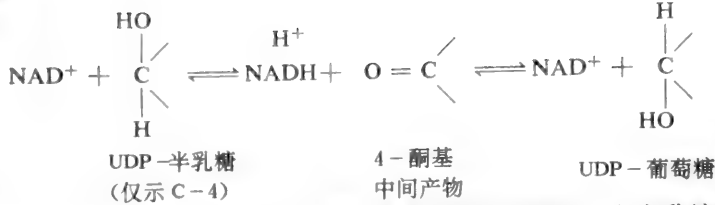
图Ⅲ-15-8 果糖进入糖酵解。

移酶所催化, 其产物为 UDP-半乳糖和葡萄糖-1-磷酸。

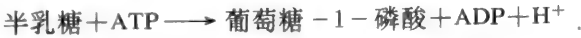


然后连接在 UDP 上的半乳糖即发生差向异构化而变成葡萄糖。在 C-4 上的羟基的构型由 UDP-半乳糖-4-差向异构化酶所转化, 此酶含有一紧密结合的 NAD<sup>+</sup>。荧光研究证明, 在催化过程中此 NAD<sup>+</sup> 被瞬时还原为 NADH。NAD<sup>+</sup> 大概接受糖的 C-4 上的氢原子, 于是形成

了一4-酮基糖。



NADH 然后将同一个 H 转移到 C-4 的另一侧，形成其差向异构体。由半乳糖激酶、转移酶和差向异构酶所催化的反应之和为：



注意，当半乳糖转变为葡萄糖时 UDP-葡萄糖并未被消耗掉，因为它又由差向异构酶从 UDP-半乳糖再生出来了。这一反应是可逆的，而且逆反应的产物也是重要的。如果膳食中的半乳糖不足以满足需要的话，UDP-葡萄糖之转变为 UDP 半乳糖就是合成复杂的多糖和糖蛋白中的半乳糖残基所必需的。

最后，葡萄糖-1-磷酸由磷酸葡萄糖变位酶异构化为葡萄糖-6-磷酸。当我们研究糖元的合成和降解时，我们还要谈到这一反应，这些变化是通过葡萄糖-1-磷酸而进行的。

### 若无转移酶，半乳糖就是毒性很大的

半乳糖-1-磷酸尿苷酸基转移酶的缺乏会引起半乳糖血，一种严重的疾病，是常染色体的隐性遗传疾病。在这种病的患者体内，半乳糖的代谢被阻断在半乳糖-1-磷酸处。患有此病的婴儿不能存活。吃奶后发生呕吐和腹泻，常有肝肿大和黄疸。其次，许多半乳糖患者智力发育迟缓。血液中的半乳糖的水平显著升高，尿中常有半乳糖。红血细胞中没有前述转移酶是无可怀疑的诊断标准。

半乳糖血的治疗方法就是排除膳食中的半乳糖。不含半乳糖的膳食会明显地引起所有临床症状的缓解，但智力发育迟缓除外，这大概不是可逆的。对某些病人，继续不断地食用半乳糖会引起死亡。半乳糖尿的为害是由于有毒物质的积累，而不是必需化合物的缺乏。病人体内能由 UDP-葡萄糖合成 UDP-半乳糖，因为其差向异构酶的活性是正常的。有毒物质之一是半乳糖醇，这是由半乳糖的还原而形成的。眼球的水晶体中醛糖还原酶的存在引起其中半乳糖醇的积累，导致水分的进入和白内障的发展。

### 磷酸果糖激酶是控制糖酵解的关键性酶

(上略) 1980 年赫斯 (H. G. Hers) 和沙弗亭根 (E. V. Schaftingen) 发现了糖酵解的另一种调节剂。他们发现一种以前不知道的代谢物， $\beta$ -D-果糖-2,6-二磷酸，是磷酸果糖激酶的强有力的活化剂。在肝脏中果糖-2,6-二磷酸 (F-2,6-BP) 所以活化磷酸果糖激酶是由于它增加了此酶对果糖-6-磷酸的亲合力，并减少了 ATP 的抑制作用。实质上，F-2,6-BP 是一种变构活化剂，它把这种四聚体的酶的构象平衡由 T 状态推向了 R 状态。

果糖-2,6-二磷酸是由果糖-6-磷酸的磷酸化而形成的，此反应由磷酸果糖激酶 2 (PFK2) 所催化，PFK2 与磷酸果糖激酶 (PFK) 是两种不同的酶。F-2,6-BP 由一种专一的磷

酸酶，果糖二磷酸酶 2 (FBP 酶-2) 水解为果糖-6-磷酸。最令人注目的发现是：PFK2 和 FBP 酶 2 均存在于一种 53kd 的多肽链中，因此可称之为纵列酶 (tandem enzyme) (图 III-15-11)。还有一些在代谢调节中重要的其他的酶也是在同一多肽链上有作用相反的催化活性 (第 16 章)。因此，果糖-6-磷酸多就会引起 F-2,6-BP 浓度增高，它又促进磷酸果糖激酶。这一过程称为前馈促进 (feed-forward stimulation)。

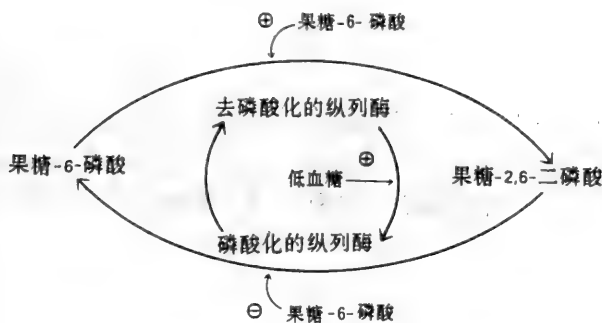


图 III-15-11 果糖-2,6-二磷酸的合成和降解的控制。果糖-6-磷酸促进 F-2,6-BP 的形成并抑制其水解。低血糖引起较高水平的磷酸化的纵列酶，因而引起较低水平的 F-2,6-BP。

其次，PFK2 和 FBP 酶 2 的活性又是由一个丝氨酸残基的磷酸化而交互控制的。当葡萄糖少时，血液中胰高血糖素这种激素的水平提高，于是引发了一系列级联反应，引起了这种双功能酶的磷酸化。这种共价修饰活化了 FBP 酶 2 而抑制了 PFK2，于是使 F-2,6-BP 的水平降低。反之，当葡萄糖多时，此酶失去了连在其上的磷酸根，于是 F-2,6-BP 的水平提高，其结果是糖酵解被促进。当我们研究糖代谢的整合时，还要回到这种引人注目的调节装置上来 (第 26 章)。

己糖激酶和丙酮酸激酶也参与糖酵解步伐的调节

(上略) 催化糖酵解中第三个不可逆步骤的酶，即丙酮酸激酶，控制着由这一途径输出的物质。这一步产生 ATP 和丙酮酸，后者是一种中心的代谢中间产物，它既可被进一步氧化，也可被用作建造基石。已发现哺乳动物有三种形式的丙酮酸激酶 (由 5.5kd 亚基组成的四聚体)：在肝脏中占优势的 L 类型，在肌肉和脑中占优势的 M 类型，在其他组织中占优势的 A 类型。这些变化都属同一主题，即同功酶，它们在结构特点和催化机理上实质上是相同的，区别仅在于它们是如何被调节的。L 同功酶以协同方式与磷酸烯醇式丙酮酸相结合。当能荷高时 ATP 通过变构作用抑制此同功酶使糖酵解变慢 (图 III-15-12)。丙氨酸 (由丙酮酸经一步合成) 也以变构方式抑制此酶，在此情况下是发出信号表示建造基石已经很多了。糖酵解中前一个不可逆步骤的产物，即果糖-1,6-二磷酸，则活化丙酮酸激酶，以使之能赶上中间产物流过来的迅速的步伐。L 同功酶的催化特性是由可逆的磷酸化作用所控制的。当血糖水平低时，胰高血糖素引发一系列级联反应，于是磷酸化的丙酮酸激酶的比例增多，这是活性较小的形

式。这种由激素引发的磷酸化的作用，也像控制着果糖-2,6-二磷酸的水平的纵列酶的作用一样，在于防止肝脏消耗过量的葡萄糖，因为此时脑和肌肉对葡萄糖的需要更为迫切。M 同功酶则与之相反，它不是由磷酸化作用可逆地控制着的，而 A 同功酶则在 M 和 L 之间，它对共价修饰的敏感程度大于 M 而小于 L。关于同功酶如何对不同器官的代谢多样性发生影响，我们还会遇到其他例子。

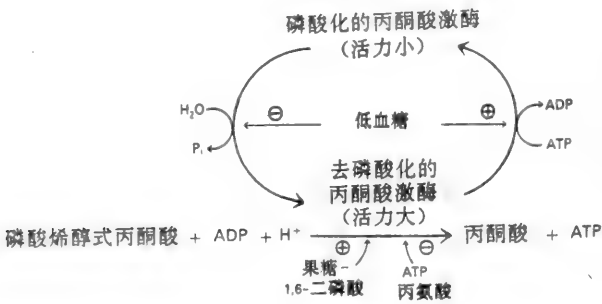


图 15-12 丙酮酸催化活性的控制。

### 磷酸甘油酸通过一种与酶结合的2,3-BPG中间物而发生相互转变

磷酸甘油酸变位酶催化 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸之间的相互转变，它需要催化量的 2,3-二磷酸甘油酸 (2,3-BPG) 才有活性。2,3-BPG 或者将其 2-或者将其 3-磷酸基供给活性部位上的组氨酸残基，以产生此酶的活化形式 (E-P)。此异构化反应开始于 3-磷酸甘油酸之结合到磷酸化的酶上。磷酸组氨酸将其磷酸基转移给结合在其上的底物的 2-OH，以形成 2,3-BPG。然后 3-磷酸基又被转移到组氨酸上，于是形成了 2-磷酸甘油酸。这里我们看到了 2,3-二磷酸甘油酸在基本的新陈代谢中的作用。很可能在红血球利用 2,3-BPG 以控制血红蛋白对氧的亲合力之前很久很久，此磷酸酯就已经存在了。

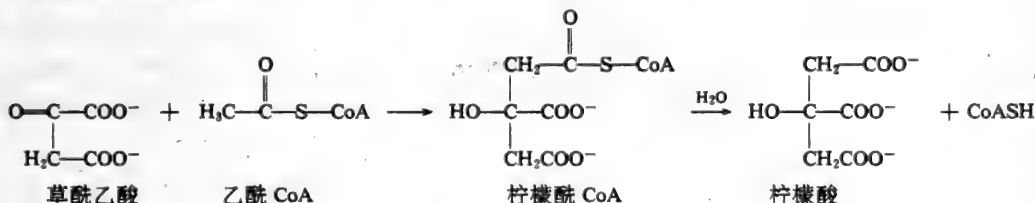
## 第16章 柠檬酸循环

### 柠檬酸异构化为异柠檬酸

(上略) 乌头酸酶含有铁原子, 但不是固定在血红素基团中的。此酶中的 4 个铁原子是与 4 个无机硫化物的键和 4 个半胱氨酸的硫原子形成复合物。这种 Fe-S 簇与柠檬酸结合, 并参与被结合的底物的脱水 and 再水化。带有 Fe-S 簇的蛋白质称为铁-硫蛋白或非血红素铁蛋白。

### 柠檬酸合酶在与草酰乙酸结合时发生大的构象变化

如前所述, 柠檬酸合酶催化草酰乙酸与乙酰辅酶 A 缩合而成为柠檬酰 CoA 的反应, 后者再被水解为柠檬酸和 CoA。



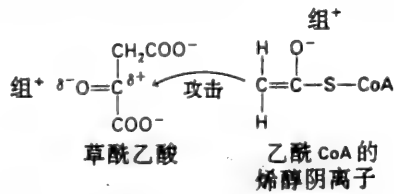
哺乳类的柠檬酸合酶由两个完全相同的 49 kd 的亚基组成。两个独立的作用部位分别位于一个亚基中大小两个结构域之间的界面上。柠檬酸合酶及其与几种底物和抑制剂所形成的复合物的 X 射线结晶学研究阐明了, 此酶在催化过程中发生很大的构象变化。草酰乙酸先结合上去, 随后是乙酰 CoA。所以发生这种有次序的结合, 其原因在于草酰乙酸诱导出一种主要的结构重排, 其结果是造成一个乙酰 CoA 的结合部位。在没有配体时所观察到的酶的开放形式在与草酰乙酸结合后就变为封闭形式了。在每一个亚基中, 小结构域都相对于大结构域旋转 18 度。由于围绕在结合的草酰乙酸周围的侧链发生了十分小的变动而引起的  $\alpha$ -螺旋的旋转, 却产生了大至 15 Å 的移动。这种构象的转变使我们想起了己糖激酶中由于葡萄糖的结合而引起的裂缝的闭合以及血红蛋白中由于  $\text{O}_2$  的结合而引起的亚基的重排。

合酶催化缩合反应是由于使底物极端靠近、使它们转向, 并使某些键极化而引起的。两个组氨酸残基起着关键的作用。其中一个与草酰乙酸的羧基氧原子相作用而使碳原子更易受到攻击。另一个组氨酸促进乙酰 CoA 的甲基碳原子上一个质子的移去, 于是形成一烯醇阴离子; 这一阴离子攻击草酰乙酸的羧基碳原子而形成一 C—C 键 (见下页)。

新形成的柠檬酰 CoA 再诱导出酶中另一些结构变化。活性部位变成完全封闭的, 一个天冬氨酸残基又参加进来, 使得一个被捕获的小分子参与硫酯键的水解。于是 CoA 离开酶, 随后是柠檬酸, 酶又回到开放的构象。

柠檬酸合酶是如此设计的, 它不会水解乙酰 CoA, 这种水解将是浪费。第一, 在草酰乙酸

已结合上并为发生缩合反应作好准备之前，乙酰 CoA 不会结合到酶上面去。第二，为硫酯键的水解而参加作用的天冬氨酸残基，在柠檬酰 CoA 形成之前是不会被引至与它极为相近的位置的。正如己糖激酶中一样，诱导出来的结合防止了不希望的副反应的发生。



### 乙醛酸循环使得植物和细菌能利用乙酸盐而生长

许多细菌和植物能利用乙酸盐或其他产生乙酰 CoA 的化合物而生长。他们利用的是这样一种代谢途径，它把二碳的乙酰基单位转变为四碳的单位（琥珀酸），以产生能量并用于生

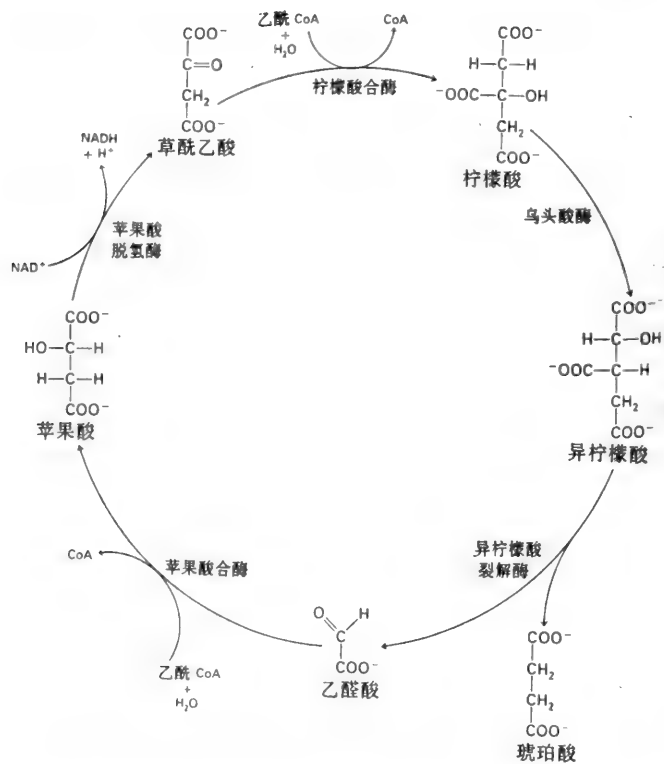
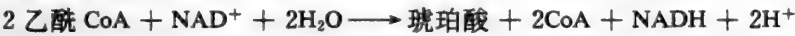


图 16-17 植物和细菌的乙醛酸循环。除去由柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶所催化的反应之外，此循环中的反应均与柠檬酸循环中的相同。

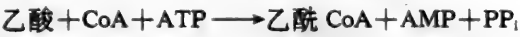


物合成。这一反应序列称为**乙醛酸循环**，绕过了柠檬酸循环中的两个脱羧步骤。另一关键性差别就是乙醛酸循环，每走一圈就有两分子乙酰 CoA 参加进去，而柠檬酸循环中只有一个。乙醛酸循环(图Ⅲ-16-17)也和柠檬酸循环一样，由乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合而形成柠檬酸开始，然后柠檬酸异构化为异柠檬酸。异柠檬酸不是发生脱羧作用，而是被**异柠檬酸裂解酶**裂解为琥珀酸和乙醛酸。以后的步骤就是由乙醛酸再生草酰乙酸。乙酰 CoA 与乙醛酸缩合形成苹果酸，此反应由**苹果酸合酶**所催化，此酶与柠檬酸合酶类似。最后，苹果酸被氧化为草酰乙酸，如在柠檬酸循环中一样。这些反应的总和是：



在植物中，这些反应发生在称为**乙醛酸循环体** (glyoxysome) 的细胞器中。

细菌和植物用乙酸和 CoA 合成乙酰 CoA，就是由**乙酰 CoA 合成酶**所催化的由 ATP 推动的反应。

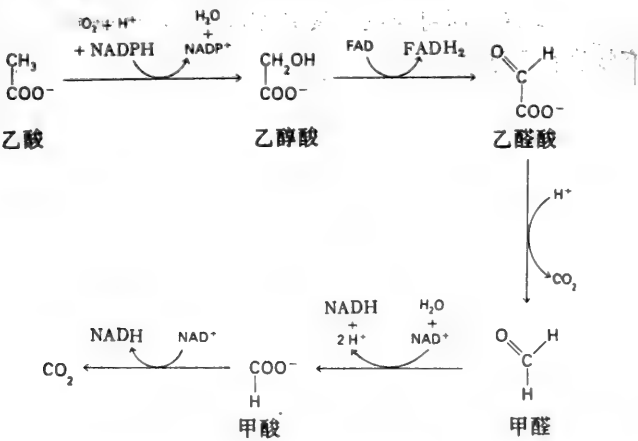


焦磷酸盐然后被水解为正磷酸盐，因此有 2~P 被消耗于乙酸的活化。在蛋白质合成中我们还将回到这种类型的活化反应，那是用于把氨基酸连接到 RNA 之上。

在某些细菌和植物体内，异柠檬酸有两个主要的命运。当需要能量时，它发生氧化性脱羧，形成  $\alpha$ -酮戊二酸。当能量充裕时，异柠檬酸裂解为琥珀酸和乙醛酸。在这一关键的分枝点上，柠檬酸循环和乙醛酸循环争夺异柠檬酸。在能量充裕（即 ATP 水平高）时，**磷酸化作用**把异柠檬酸脱氢酶关掉，于是异柠檬酸流入乙醛酸途径，用于生物合成中间物的形成。使异柠檬酸脱氢酶磷酸化的激酶和从修饰的酶上除去磷酸基的磷酸酶位于同一多肽链上，正如在糖酵解的控制中调节着果糖-2,6-二磷酸水平的激酶-磷酸酶这一纵列酶一样（第 15 章）。

### 柠檬酸循环能量产率高，所以在进化中被选中

为什么在进化过程中出现了柠檬酸循环？人们可以想像一种简单的反应序列(图Ⅲ-16-19)，它可以把乙酸氧化成  $\text{CO}_2$ ，而不必先与草酰乙酸结合。



图Ⅲ-16-19 把乙酸直接氧化成  $\text{CO}_2$  的假想的直接途径。这一途径的能量产率为柠檬酸循环的一半。

这种直接途径没有出现，因为在能学上它不如柠檬酸循环效率高。第一步，即乙酸氧化为乙醇酸，不能与任何产生能量的脱氢作用相偶联；而是必须利用分子态氧将乙酸的甲基变为羟甲基。O<sub>2</sub> 中的另一个氧原子则必须被还原剂（如 NADPH）还原为水。单加氧酶催化这种类型的反应。



消耗 1 个 NADPH 相当于输入 3 个 ATP；这一直接途径中的后几个步骤可能产生 1 个 FADH<sub>2</sub> 和 2 个 NADH，通过氧化磷酸化它们可能产生 8 个 ATP。因此，这一途径总共产生 5 个 ATP。与此相反，通过柠檬酸循环氧化乙酸则产生 10 个 ATP，因为 2~P 被消耗于由乙酸形成乙酰 CoA，而 12 个 ATP 则产生于乙酰 CoA 之氧化为 CO<sub>2</sub>。因此，**柠檬酸循环的 ATP 产量比直接途径的两倍还多。**

很清楚，将乙酰基与一载体如草酰乙酸结合起来比用氧直接攻击它能汲取多得多的能量。出现一个反应的循环理由也很清楚：**载体必须能再生。**假设草酰乙酸不能再生，那么一个人每天为取得 2500 千卡所摄取的膳食中所产生的乙酰基被氧化，就需要 1 千克草酰乙酸。合成这么大量草酰乙酸的能耗将远远超过与其结合的乙酰基的氧化所产生的能量。为什么特别出现了柠檬酸循环呢？很可能是因此循环的最初几个步骤——柠檬酸的合成，它的异构化为异柠檬酸以及形成 α-酮戊二酸的氧化性脱羧反应——都是在大气中出现氧以前就早已出现了。最为重要的是，辅酶 A 是一古老的分子，核糖核苷酸。柠檬酸循环的第一步可能正是反映了早期的 RNA 世界的特点。

## 第17章 氧化磷酸化

呼吸链由三种酶复合物组成，其间由两种可移动的电子载体连接起来

(文从略)。

表 II-17-2 线粒体中电子传递链的组分

酶复合物	质量 (kd)	亚基	辅基	结合部位的位置		
				衬质侧	碳氢核	胞液侧
NADH-Q-还原酶	850	25	FMN Fe-S	NADH	Q	
琥珀酸-Q-还原酶	140	4	FAD Fe-S	琥珀酸	Q	
细胞色素还原酶	250	9	血红素 b <sub>562</sub> 血红素 b <sub>566</sub> 血红素 c <sub>1</sub> Fe-S		Q	细胞色素 c
细胞色素 c	13	1	血红素 c			细胞色素 c <sub>1</sub> 细胞色素 a
细胞色素氧化酶	160	8	血红素 a 血红素 a <sub>3</sub> Cu <sub>A</sub> 和 Cu <sub>B</sub>			细胞色素 c

来源: J. W. DePierre and L. Ernster, *Ann. Rev. Biochem.* 46 (1977): 215; Y. Hatefi, *Ann. Rev. Biochem.* 54 (1985): 1015.

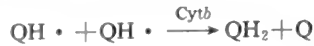
注: 所有组分均为膜本体蛋白, 但细胞色素 c 为水溶性膜外围蛋白, 而辅酶 Q 为脂溶性醌。

电子从还原型泛醌经过细胞色素还原酶流向细胞色素 c

(上略)。细胞色素还原酶本身含有两种细胞色素, 称为 b 和 c<sub>1</sub>。此还原酶还含有一种 Fe-S 蛋白和几种其他多肽链。(下略)。还原型泛醌 (ubiquinol) 将它的两个高电势电子中的一个传递给还原酶中的 Fe-S 中心。这一电子然后依次被穿梭传递给细胞色素 c<sub>1</sub> 和 c, 它们把此电子带走, 离开还原酶复合物。这种一个电子的传递过程把还原型泛醌 (QH<sub>2</sub>) 转变为半醌 (QH·)。

留在半醌中的一个电子又怎样呢? 这就是带有两个血红素基团的细胞色素 b<sub>1</sub> 登上舞台的地方。它的两个相同的血红素基团, 由于处在不同的多肽环境中, 所以有不同的电子亲和力

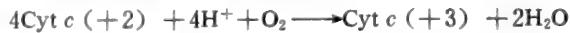
和不同的光谱特性。其中之一称为  $b-566$ ，另一个称为  $b-562$ ，因为它们的吸收高峰分别在 566 和 562nm。QH· 将电子传递给  $b-566$ ， $b-566$  再还原  $b-562$ ，而  $b-562$  则将 QH· 还原为  $QH_2$ 。这样，细胞色素  $b$  所催化的净反应为：



实质上，还原酶中的细胞色素  $b$  这一组分是一种再循环的装置，它使得两个电子的载体（还原型泛醌）能够与一个电子的载体（Fe-S 中心）相互作用。

## 细胞色素氧化酶催化电子从细胞色素 $c$ 到 $O_2$ 的传递

细胞色素氧化酶催化电子从细胞色素  $c$  到  $O_2$  的传递：

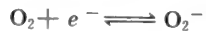


4 个电子被传至  $O_2$  将其完全还原为  $H_2O$ ，同时将质子从线粒体内膜的衬质侧泵至胞液侧。胞液侧一词是指与衬质侧相对的内膜的另一侧，因为胞液中的大多数小分子都可以自由地到达这一侧。线粒体的外膜上有小孔，可令大多数代谢物通过。

这一反应是由一种至少有 8 种亚基组成的复合物进行的，这些亚基中有 3 种（称为亚基 I，II，III）是由线粒体本身的基因组编码的。细胞色素氧化酶含有两个血红素 A 基团和两个铜离子。血红素 A 与细胞色素  $c$  和  $c_1$  中的血红素不同，一个醛基代替了一个甲基，一个碳氢链代替了乙烯基。两个血红素虽然在化学上是完全相同的，但性质不同，因为它们位于细胞色素氧化酶的不同部分。其中之一称为血红素  $a$ ，另一个称为血红素  $a_3$ 。同样，称为  $Cu_A$  和  $Cu_B$  的两个铜离子也是不同的，因为它们与蛋白质的结合不同。血红素  $a$  靠近  $Cu_A$ ，在亚基 II 中；血红素  $a_3$  靠近  $Cu_B$ ，在亚基 I 中。细胞色素氧化酶的氧化-还原单位称为细胞色素  $a$  和  $a_3$ ，位于亚基 I 和 II 中。

亚铁细胞色素  $c$  把它的电子给予血红素  $a-Cu_A$  簇，然后此电子再传递至血红素  $a_3-Cu_B$  簇，在此处  $O_2$  通过一系列的步骤被还原为 2 分子  $H_2O$ 。

分子态氧是理想的末端电子受体。它对电子的高亲和力为氧化磷酸化提供了巨大的热力学推动力。其次， $O_2$  与其它强电子受体（如  $F_2$ ）不同，除非被催化剂活化，否则反应非常缓慢。然而，在氧的还原作用中仍潜在着危险。4 个电子的传递导致安全的产物（2 分子  $H_2O$ ），但部分的还原则产生非常有害的化合物。特别是当一个电子传递给氧时，会形成一种破坏性很强的化合物，超氧物负离子（superoxide anion）：



超氧物负离子

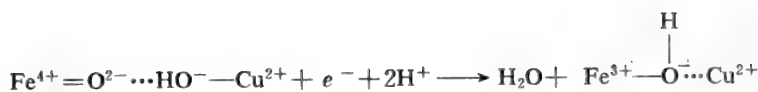
$O_2$  的安全还原的策略是清楚的：催化剂一定不能释放部分还原的中间产物。细胞色素氧化酶满足了这一严格的要求，它把  $O_2$  结合在其  $a_3-Cu_B$  中心的  $Fe^{2+}$  与  $Cu^+$  离子之间。然后每一个金属给予  $O_2$  一个电子，把它转变为一个双负离子：



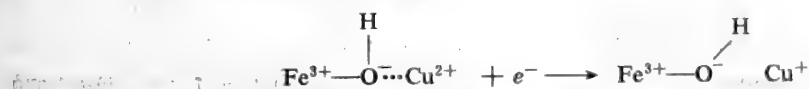
由  $a-Cu_A$  中心输入一个电子，于是形成一四价铁的中间产物（ferry intermediate）：



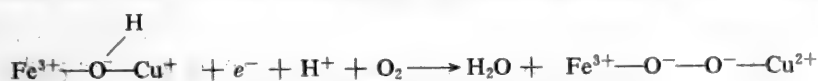
接受第二个电子后，形成并释放水，于是剩下一个与  $Fe^{3+}$  结合的  $OH^-$ ：



第三个电子则将二价铜还原为一价铜：



在这一循环的最后一步，一个电子和  $\text{O}_2$  参加，产生  $\text{H}_2\text{O}$  并形成结合了氧的双负离子：



在这一循环的 4 个步骤中，有 3 个步骤是质子与电子同时进入循环。

ATP 是由一酶复合物合成的，此复合物由传递质子的单位  $\text{F}_0$  和催化单位  $\text{F}_1$  组成

(上略) 细菌的 ATP 合酶，也和线粒体的一样，含有一亲水的  $\text{F}_1$  单位和一疏水的  $\text{F}_0$  单位。细菌的  $\text{F}_1$  的结构也是  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 。 $\text{F}_0$  由三种链组成——a, b 和 c——其分子比约为 1:2:10。细菌的合酶在这一点上比线粒体的简单： $\text{F}_0$  直接联在  $\text{F}_1$  上而不是通过一个起连接作用的柄。在大肠杆菌中，ATP 合酶的 8 种类型亚基的基因彼此相邻(图 III-17-25)。这组基因称为 *unc* 操纵子，已被克隆，其顺序也已被测定。催化部位在  $\beta$  链上。同源的  $\alpha$  链上也有 ATP 和 ADP 的结合部位。质子之从  $\text{F}_0$  流向  $\text{F}_1$  是由  $\gamma$  亚基控制的，它起着大门的作用。亚基 c 的氨基酸顺序说明它大概有两个跨膜区域。很可能质子通道是由亚基 c 的多个拷贝联合在一起而形成的。

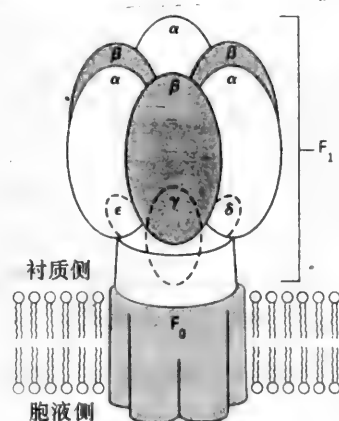


图 III-17-24 ATP 合酶示意图。示传递质子的  $\text{F}_0$  单位和合成 ATP 的  $\text{F}_1$  单位。[F. M. Harold. *The Vital Force; A Study of Bioenergetics* (W. H. Freeman, 1986), p. 238.]

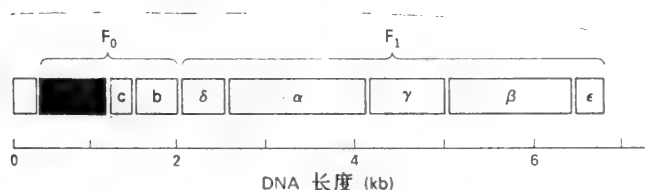
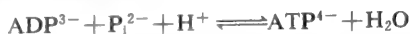


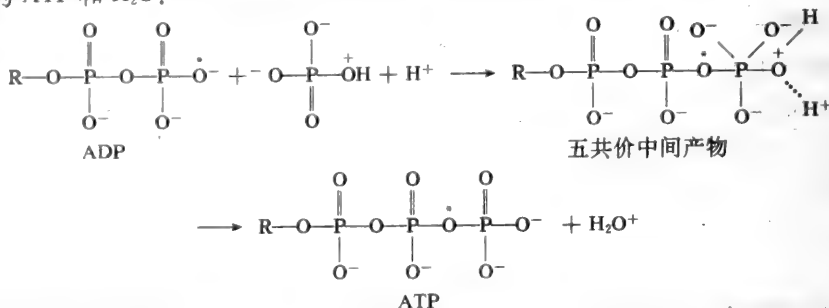
图 III-17-25 大肠杆菌中编码 ATP 合酶亚基的基因的排列。这组基因称为 *unc* 操纵子 (*unc* 表示非偶联的)。

## 通过 ATP 合酶的质子流使牢固结合的 ATP 被释放

ATP 合酶催化 ADP 与正磷酸根形成 ATP:

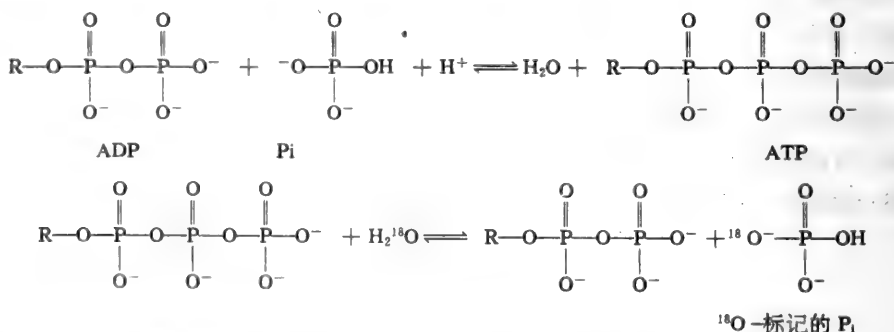


必须注意,真正的底物是 ADP 和 ATP 与  $\text{Mg}^{2+}$  的络合物,和所有已知的有这些核苷酸参加的磷酸基转移反应一样。ADP 的末端氧原子攻击  $\text{P}_i$  的磷原子,形成一五共价的中间产物,而后它再解离为 ATP 和  $\text{H}_2\text{O}$ :



ADP 中起攻击作用的氧原子( $\text{O}^\bullet$ )和  $\text{P}_i$  中离去的氧原子( $\text{O}^+$ )分别位于双角锥体的两个顶端。起攻击作用的和离去的基团的这种线状排列(in line geometry)在核糖核酸酶 A 的催化机理中也是如此。

质子的流动如何推动 ATP 的合成?据推测,一种可能是流经  $\text{F}_0$  的能化的质子全部集中于  $\text{F}_1$  的催化部位,并在该处从  $\text{P}_i$  上移去一个氧而使平衡偏于 ATP 的合成。然而出人意料,同位素交换实验却表明:在没有质子电力的情况下可迅速形成与酶结合的 ATP。当把 ADP 和  $\text{P}_i$  加于  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中的 ATP 合酶时, $^{18}\text{O}$  掺入到  $\text{P}_i$  中。 $\text{P}_i$  所以获得同位素标记是由于 ATP 被  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  所水解。



$^{18}\text{O}$  掺入  $\text{P}_i$  的速率证明,即使在没有质子电力的情况下,在催化部位上大约有等量的结合态 ATP 和结合态 ADP 处于平衡中。不过除非质子流通过酶,ATP 不会离开催化部位。波以耳(P. Boyer)证明质子梯度的作用不是形成 ATP,而是使之离开酶。他还发现这种酶的核苷酸结合部位彼此有相互作用。ADP 和  $\text{P}_i$  结合到一个部位,促进 ATP 从另一部位释放出去。换言之,ATP 合酶表现催化的协同效应(catalytic cooperativity)。

波以耳提出了一个关于质子推动 ATP 合成的结合-交换机理(binding-change mechanism)。在这一模型中,3 个起催化作用的  $\beta$  亚基在本质上是完全相同的,但在功能上却

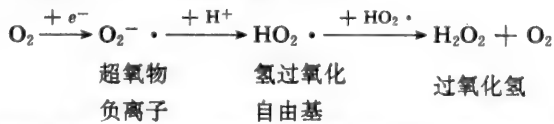
不是在任何特定时刻都是相等的。一个催化部位处于 O 形式，即开放的，对于底物的亲和力极低。第二个处于 L 形式，与底物松散地结合，但无催化活性。第三个处于 T 形式，它与底物紧密结合，并有活性。考虑一个酶分子，ATP 结合在其 T 部位，然后 ADP 和  $P_i$  就结合在其 L 部位。由质子流而输入的能量把 T 部位变成为 O 部位，L 部位变成为 T 部位，而 O 部位变成为 L 部位。这些转变使得 ATP 从新的 O 部位上被释放出来，而在新的 T 部位（原来的 L 部位）上又由 ADP 和  $P_i$  形成了 ATP。只有当 O、L 和 T 相互转变时，质子才会从  $F_0$  流到膜的  $F_1$  侧。这些构象转变十分可能是由亚基的相互作用的变化而联系起来的。

为什么  $\beta$  链在一定时刻其功能不相同呢？3 个  $\alpha\beta$  链只与一个  $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  链相互作用。因此，在一特定时刻，3 条  $\beta$  链是处于不同环境中的，这就产生了截然不同的 O、L 和 T 部位。还不知道质子流如何引起各部位的开和关。

ATP 合酶是由质子电力推动的，而质子电力则是 pH 梯度和膜电势的总和，如  $\Delta p$  的方程式所示。例如，pH 梯度可能引起天冬氨酸残基在 pH 4.5 下呈  $-\text{COOH}$  形式（当对着胞液侧时），在 pH 7.5 下则呈  $-\text{COO}^-$  形式（当对着衬质侧时）。然后一侧的质子化和另一侧的去质子化就能推动一反应循环以单方向进行，达到 ATP 的净合成。膜电势如何能达到最后的结果呢？假设膜电势为 0.18 伏（胞液侧为正），而两边的 pH 均为 7.5。 $F_0$  通道中的  $H^+$  浓度不会是均匀的，因为  $H^+$  将被膜的衬质侧所吸引，这一侧比另一侧负。0.18 伏的电势差将使  $F_0-F_1$  连接处的  $H^+$  浓度比  $F_0$  通道入口处的高 1000 倍。这样，正的膜电势会由于在  $F_0$  与  $F_1$  之间的大门处产生一高的局部的  $H^+$  浓度而引起 ATP 的合成。具体地说，0.18 伏会产生和两侧 3 个 pH 单位之差一样的  $H^+$  浓度差。近年来的研究提出了这种可能性，即呼吸复合物（质子源）所泵出的质子可能优先向 ATP 合酶（质子库）扩散，而不是在膜间空间的介质中发生平衡。

## O<sub>2</sub> 的有毒衍生物（如超氧化物自由基）为保护性酶所清除

如前所述，O<sub>2</sub> 的一电子还原产生 O<sub>2</sub><sup>-•</sup>，超氧化物负离子，这是一种化学上活泼的破坏性自由基。还原 O<sub>2</sub> 的细胞色素氧化酶和其他蛋白质的特性是不释放 O<sub>2</sub><sup>-•</sup>。可是，少量的超氧化物负离子的形成还是不可避免的，例如血红蛋白的亚铁(Fe<sup>2+</sup>)血红素基团被 O<sub>2</sub> 氧化为高铁(Fe<sup>3+</sup>)血红素时即如此。超氧化物负离子的质子化产生氢过氧化自由基(hydroperoxyl, HO<sub>2</sub><sup>•</sup>)，它能自发地与另一 HO<sub>2</sub><sup>•</sup> 反应，形成过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。



超氧化物负离子能被超氧化物歧化酶所清除，此酶存在于所有需氧生物中，它催化两个这样的自由基转变为过氧化氢和分子态氧。



真核生物的胞液中的这种酶的活性部位含有一个铜离子和一个锌离子，它们与一个组氨酸残基的侧链形成配位键。带负电荷的超氧化物被静电引力引至一个通道底部的正电荷极强的催化部位。O<sub>2</sub><sup>-•</sup> 与 Cu<sup>2+</sup> 和精氨酸残基的胍基相结合。一个电子由超氧化物传至 Cu<sup>2+</sup>，而形成 Cu<sup>+</sup> 和 O<sub>2</sub>，氧被释放。第二个超氧化物进入活性部位，并与 Cu<sup>+</sup>、精氨酸和 H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> 相结合。被结合的 O<sub>2</sub><sup>-•</sup> 从 Cu<sup>+</sup> 获得一个电子，从与其结合的伙伴获得两个质子，于是形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，并再生

酶的  $\text{Cu}^{2+}$  状态。

由超氧化物歧化酶所形成的和由氢过氧化基的非催化反应所形成的过氧化氢则由**过氧化氢酶**清除。这种酶是独一无二的血红素蛋白，它催化过氧化氢歧化为水和分子态氧的反应。



**过氧化物酶**也是一种血红素酶，它催化一类似反应，过氧化氢被一还原剂 ( $\text{AH}_2$ ) 还原为水。





## 第 18 章 戊糖磷酸途径和葡萄糖异生作用

### 葡萄糖异生作用和糖酵解是相互调节的

葡萄糖异生作用和糖酵解作用是相互协调的，所以当一条途径活性很高时，另一条途径的活性就相对地较低。假设两组反应在同时都很活跃，那么净结果就会是每个反应循环发生 4 个 $\sim\text{P}$  (2ATP 加 2GTP) 的水解。在细胞内的条件下，糖酵解和葡萄糖异生作用都是高度放能的，所以对这种循环没有热力学的障碍。不过，每一途径的有代表性的酶的活性都是受到控制的，所以这两条途径不会同时有极高的活性。糖酵解的速率也是由葡萄糖的浓度所决定的，而葡萄糖异生的速率则由乳酸的和葡萄糖的其他前体的浓度所决定。

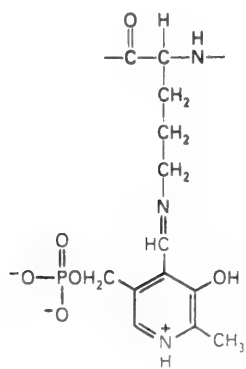
果糖-6-磷酸和果糖-1,6-二磷酸的相互转变是控制的关键。AMP 促进磷酸果糖激酶而抑制果糖-1,6-二磷酸酶。柠檬酸的效应相反。这些酶又交互地被果糖-2,6-二磷酸所控制，这是由果糖-6-磷酸衍生的信号分子。当葡萄糖多时，由激素引发的一连串级联反应导致高水平的果糖-2,6-二磷酸 (F-2,6-BP)，它促进磷酸果糖激酶，而抑制果糖-1,6-二磷酸酶。于是糖酵解加速，而葡萄糖异生作用减慢。饥饿时，F-2,6-BP 的水平降低，它使磷酸果糖激酶的活性降低，而使磷酸酶的活性提高。其结果是果糖-1,6-二磷酸转变为果糖-6-磷酸而产生葡萄糖。这样，在决定葡萄糖究竟是被降解还是被合成方面，果糖-2,6-二磷酸起着重要的作用。

丙酮酸激酶和丙酮酸羧化酶也是相互调节的。果糖-1,6-二磷酸促进丙酮酸激酶，ATP 抑制它；而乙酰 CoA 促进丙酮酸羧化酶，ADP 则抑制它。当细胞的能荷低时，ADP 也抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶。因此，当细胞中燃料分子和 ATP 丰富时，利于丙酮酸流向磷酸烯醇式丙酮酸，也有利于葡萄糖异生作用。

## 第19章 糖原代谢

### 吡哆醛磷酸参与糖原的磷酸解作用

底物糖原和产物葡萄糖 1-磷酸的 C-1 上都是  $\alpha$ -构型。对于研究磷酸化酶的催化机理,保持此构型这一事实是有价值的线索。磷酸根直接攻击糖的 C-1 一定会改变这个碳上的构型。所形成的葡萄糖 1-磷酸具有  $\alpha$  而不是  $\beta$  构型,这一发现有力地说明需要的是双数步骤(最简单的就是两步)。最可能的似乎是形成正碳离子中间产物,就像溶菌酶所催化的细菌细胞壁多糖的水解中那样。



图Ⅲ-19-4 吡哆醛磷酸与磷酸化酶活性部位的赖氨酸残基形成希夫碱。

关于磷酸化酶催化机理的第二个线索就是它需要吡哆醛-5'-磷酸 (PLP), 这是吡哆醇 (维生素 B<sub>6</sub>) 的衍生物。这种辅酶的醛基与酶的特殊的赖氨酸残基形成希夫碱(图Ⅲ-19-4)。X 光衍射和核磁共振的研究说明,起作用的正磷酸根位于 PLP 的 5'-磷酸基团与底物糖元之间。PLP 的 5'-磷酸基团与正磷酸根成纵列地起作用,大概是起质子的供体和受体的作用(如一般的酸-碱催化剂那样)。正磷酸根(以  $\text{HPO}_4^{2-}$  的形式)将质子给予离去的糖原链的 O-4, 同时又从 PLP 得到一个质子。在这一步骤中所形成的正碳离子中间产物,然后又被正磷酸根所攻击而形成葡萄糖-1-磷酸。我们将在第 21 章中看到在别的酶中 PLP 的作用是完全不同的。磷酸化酶所面临的特殊挑战是用磷解法,而不是用水解法裂解糖原,以获得一个  $\sim\text{P}$ 。这就要求把水排除在活性部位之外,因此 PLP 起了特殊的作用,像一个普通的酸碱催化剂一样。

### 已知许多种由遗传决定的糖原贮存疾病

(上略)关于这些病人(麦克阿德尔氏病,前表 16-1)的磷-31 核磁共振的研究提供了许多资料。在激烈运动时,正常人的骨骼肌细胞的 pH 下降,因为产生了乳酸。与此相反,患有麦克阿德尔氏病的病人的肌肉细胞在运动时变得越来越碱(因为磷酸肌酸分解),而没有糖酵解中间产物的积累。这一发现表明缺陷在糖酵解的第一步之前。NMR 研究还表明,这种疾病的令人痛苦的痉挛与 ADP 的高水平有关。在评估这种疾病的饮食疗法和运动疗法方面, NMR 波谱法是一种有价值而又对人无伤的方法。

## 第20章 脂肪酸代谢

### 肉毒碱将长链的活化的脂肪酸带入线粒体衬质

(上略) 然后移位酶使酰基肉毒碱穿过线粒体内膜。酰基又被运回至膜的衬质侧的 CoA 上。由肉毒碱酰基转移酶 II 所催化的这一反应在热力学上是可行的, 因为肉毒碱中 O-酰基键的基因转移势高。最后, 移位酶又将肉毒碱运回至胞液侧, 与进来的酰基肉毒碱相互交换。

### 真核生物中脂肪酸由多功能的酶复合物合成

与大肠杆菌的不同, 真核生物的脂肪酸合酶是清清楚楚的多酶复合物。酵母中的这种酶质量为 2200kd, 在电镜照片上呈椭球体形, 长 250 Å, 横截面直径 210 Å。它仅由两种多肽链组成, 其亚基组成为  $\alpha, \beta$ 。α 链 (185kd) 含有酰基载体蛋白、缩合酶和 β-酮酰基还原酶, 而 β 链 (175kd) 则含有乙酰基转酰基酶、丙二酰转酰基酶、β-羟酰基脱水酶和烯醇基还原酶。

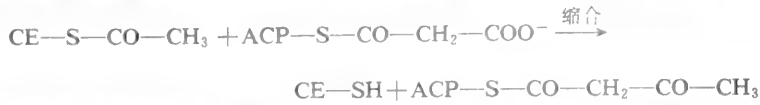
哺乳类的脂肪酸合酶是由相同的亚基组成的二聚体。每条链折叠成 3 个结构域, 其间由形状易变的区域连接起来, 这是由蛋白酶水解实验证明的。结构域 1 是底物进入和发生缩合作用的单位, 它含有乙酰基转移酶、丙二酰转移酶和 β-酮酰基合酶 (缩合酶)。结构域 2 为还原单位, 它含有酰基载体蛋白、β-酮酰基还原酶、脱水酶和烯醇基还原酶。结构域 3 为释放软脂酸的单位, 它含有硫酯酶。注意到这一点是有趣的, 即许多真核生物的多酶复合物是多功能的蛋白质, 在一条多肽链中以共价键连接着不同的酶。这种安排的一个优点就是不同酶的合成是相互协调的。其次, 由共价键连接在一起的酶组成的多酶复合物要比由非共价的引力连接在一起的稳定得多。看来很可能的是, 像脂肪酸合酶这样的多功能酶在进化过程中是由外显子的掺合而出现的。

### ACP 的形状易变的磷酸泛酰巯基乙胺单位将底物 从一个活性部位运载至另一活性部位

动物体内脂肪酸的合成起始于乙酰 CoA 的乙酰基连接到乙酰基转移酶的活性部位的丝氨酸侧链中的氧原子上。丙二酰 CoA 中的丙二酰基也通过氧原子而连接到丙二酰转移酶的活性部位上。这些起始反应发生在合酶的结构域 1 中。然后乙酰基被转移至缩合酶的活性部位的半胱氨酸硫上, 而丙二酰单位则被转移到此二聚体的另一条链的酰基载体蛋白 (ACP) 的磷酸泛酰巯基乙胺基的硫原子上。这一二聚体的每一条链的结构域 1 与另一条链的结构域 2 和 3 相互作用。这样, 合酶的两个功能单位中的每一个都是由不同链中的多个结构域组成的。事

实上，催化作用的活动中心正是在相对的两条链上的结构域间的界面上。

延长开始于缩合酶上的乙酰基单位与 ACP 上丙二酰单位的二碳部分连接。CO<sub>2</sub> 释放出来，而 ACP 上则形成乙酰乙酰基-S-磷酸泛酰巯基乙胺单位 (C 代表缩合酶)：



缩合酶上活性部位的硫氢基仍保留不变。然后乙酰乙酰基被传递至相对链上的结构域 2 中的 3 个作用中心，并被还原为丁酰基单位。这一饱和的 C<sub>4</sub> 单位然后由 ACP 的磷酸泛酰巯基乙胺单位的硫上转移到缩合酶的半胱氨酸硫上。现在合酶又为下一轮的延长作好了准备。下一步是缩合酶上的丁酰单位与 ACP 上丙二酰单位的二碳部分连接，在 ACP 上形成一 C<sub>6</sub> 单位，它又进行还原。再有五轮缩合作用和还原作用就产生一在 ACP 上的软脂酰 (C<sub>16</sub>) 链，它被相对链的结构域 3 上的硫酯酶水解为软脂酸。正在生长的脂肪酰链在延长的每一轮中都在 ACP 与缩合酶之间来回移动，这是值得注意的。在蛋白质合成中，正在生长的肽链也在核糖体的两个部位上发生类似的移动。

对于这种多酶复合物的功能，磷酸泛酰巯基乙胺部位的易变性和它的最大长度为 20 Å 是至关重要的。酶的亚基不需要发生大的结构上的重排就可与底物相互作用。相反，底物是在多酶复合物的长的、可变的臂上，此臂能达到许多活性部位中的每一个。回忆一下，生物素和硫辛酰胺也是在其多酶复合物的长的、可变的臂上。酵母和高等生物的脂肪酸合酶的组织提高了整个过程的效率，因为中间产物是从一个活性部位直接转移到下一个上。反应物没有在胞液中被稀释。而且，它们不必通过随机的扩散使彼此碰到一起。这种多酶复合物的另一个优点是共价结合的中间产物是被隔离的，免于发生竞争性反应。

### 脂肪酸的延长和不饱和化由辅助性酶系统进行

(上略) (硬脂酰 CoA 转变为油酰 CoA) 这一反应是由 3 种与膜结合的酶所组成的复合物所催化的，这三种酶是：NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶、细胞色素 b<sub>5</sub> 和一种去饱和酶 (图 III-20-18)。



图 III-20-18 脂肪酸去饱和作用中的电子传递链。

首先，电子由 NADH 传递至 NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶的 FAD 部分。然后细胞色素 b<sub>5</sub> 的铁原子被还原成亚铁形式。去饱和酶的非血红素铁原子随后被转变成 Fe<sup>2+</sup> 状态，这使得它能与 O<sub>2</sub> 和脂肪酰 CoA 底物相互作用。于是形成了一个双键，并释放出两分子水。两个电子来自于 NADH，两个来自于脂肪酰的单键。(下略)。

## 脂肪酸代谢的控制

脂肪酸氧化的速率主要由底物的可利用性来决定。在饥饿时，由于脂肪细胞的脂肪酶被诸如肾上腺素和胰高血糖素这样一些激素所激活，游离脂肪酸的水平提高。各种脂肪酰 CoA 之进入线粒体衬质也是受到调节的。当燃料分子丰富时，丙二酰 CoA 的水平就高，它抑制肉毒碱酰基转移酶 I。因此，当脂肪酰 CoA 类很多时，它们并不能迅速进入线粒体衬质。其次，当能荷高时， $\beta$ -氧化途径中的两种酶受到抑制。NADH 抑制 3-羟酰基 CoA 去氢酶，乙酰基 CoA 抑制硫酯酶。

当碳水化合物很多而脂肪酸又少时，脂肪酸的合成最多最快。短期的和长期的控制机理都是重要的。胞液中柠檬酸的浓度在脂肪酸合成的短期控制中是最重要的因素。如前所述，柠檬酸促进乙酰 CoA 羧化酶，此酶催化丙二酰 CoA 的形成，这是脂肪酸合成中的关键步骤。当乙酰 CoA 和 ATP 都多时，柠檬酸的水平就高。异柠檬酸脱氢酶为高能荷所抑制。因此，柠檬酸多就表示有二碳单位和 ATP 可用于脂肪酸合成。柠檬酸对乙酰 CoA 羧化酶的影响为软脂酰 CoA 所对抗，当有过量脂肪酸时软脂酰 CoA 就多。软脂酰 CoA 也抑制将柠檬酸运出线粒体的转运酶和产生 NADPH 的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

乙酰 CoA 羧化酶也是由可逆的磷酸化作用控制的。当血糖水平低时，胰高血糖素被释放出来。胰高血糖素与肝细胞质膜上的受体结合而引发一连串的级联反应，于是环式 AMP 形成，最终将进行磷酸化的酶，即蛋白质激酶活化，而这种激酶在糖原代谢的调节中是重要的。乙酰 CoA 羧化酶，和糖原合酶一样，是由磷酸化作用关闭的。因此，当血液中葡萄糖水平低时，脂肪酸的合成即停止。胰岛素是燃料丰富的信号，因此它对乙酰 CoA 羧化酶的效应相反，并因而促进脂肪酸的合成。

参与脂肪酸合成的酶类的合成和降解速率的变化是长期控制的媒介。先被饥饿随后又以高碳水化合物和低脂肪酸的饲料进行饲喂的动物，在几天之内其体中乙酰 CoA 羧化酶和脂肪酸合酶的量就显著增多。这种类型的调节称为适应性调节。

## 第 21 章 氨基酸的降解和循环

### 当底物形成希夫碱联结时，天冬氨酸转氨酶的活性部位的裂缝关闭

线粒体中天冬氨酸转氨酶的 X 射线结晶学研究提供了关于 PLP 和底物如何结合的详细的看法，而且证实了大部分所假设的催化机理。这种二聚体的相同的 45kd 亚基中的每一条都是由一个大的和一个小的结构域所组成的。PLP 与大的结构域相结合，并存在于亚基界面附近的一个口袋当中（图 III-21-3）。PLP 的吡啶中的氮原子与天冬氨酸的羧基形成氢键，其 2-甲基则与几个疏水残基以范德瓦尔斯力相接触。3-羟基发生电离，并与酪氨酸的酚羟基形成氢键。PLP 的 5-磷酸基团与 7 个基团形成氢键。它的 2 个负电荷为 1 个精氨酸侧链和 1 个  $\alpha$ -螺旋的氨基末端的正偶极所平衡。正如以前根据光谱学和化学的研究所提出的，X 射线结晶学已证明 PLP 的 4-醛基与一赖氨酸残基形成希夫碱联结。

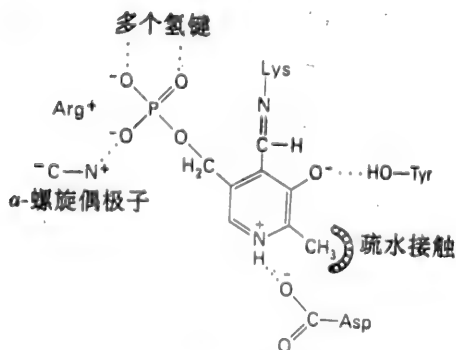


图 III-21-3 PLP 与天冬氨酸转氨酶的结合方式 [据 J. F. Kirsch, G. Eichele, G. F. Ford, M. G. Vincentt, and J. N. Jansoni. *J. Mol. Biol.* 174 (1984): 510.]

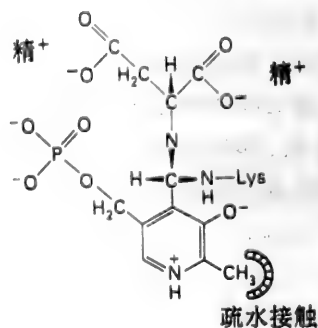


图 III-21-4 在天冬氨酸转氨酶的四面体中间产物中天冬氨酸的结合方式 [同图 III-21-3]。

天冬氨酸（或谷氨酸）的两个羧基与转氨酶的精氨酸残基形成盐桥（图 III-21-4）。与各种链上的胍基之间的这种静电的相互作用在很大程度上决定了酶的底物专一性。而且，这些相互作用还引起小结构域的相当的移动，这种移动则关闭了活性部位的裂缝。回忆一下，己糖激酶和柠檬酸合酶在催化过程中也发生裂缝的关闭。随后赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基被底物的  $\alpha$ -氨基所取代，这引起了 PLP 环的 30 度倾斜，从而促进了以后的转变。特别是， $C_{\alpha}-H$  键变得几乎与 PLP 环的平面相垂直。这种取向有利于  $\alpha-H$  的释放，以形成酞式的中间产物。再质子化则

产生酮亚胺，它的水解产生草酰乙酸，一种  $\alpha$ -酮酸。在以后的步骤中，起初与 PLP 形成希夫碱连接的赖氨酸的氨基，既起着质子受体又起着质子供体的作用。

吡哆醛磷酸是变化多端的辅酶，  
它催化氨基酸的许多反应

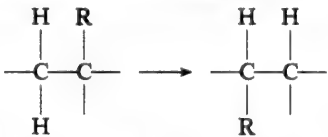
转氨作用只是 PLP 酶类所催化的许许多多氨基酸转化作用中的一种反应。在氨基酸的  $\alpha$ -碳原子上的其他反应是：脱羧反应、脱氨反应、消旋化反应和醛醇裂解反应。此外，PLP 酶类还催化氨基酸底物的  $\beta$ -碳原子上的（如色氨酸合成酶）和  $\gamma$ -碳原子上的（如胱硫醚酶）消除反应和取代反应。作为这些多种多样反应的基础的 PLP 催化作用的共同特点是：（1）由氨基酸底物（胺组分）与 PLP（羰基组分）形成希夫碱。（2）PLP 的质子化的形式起着电子库的作用以使催化作用的中间产物稳定化，这中间产物是带负电荷的——PLP 的环中的氮从底物氨基酸吸引电子。换言之，PLP 是一种亲电子的催化剂。（3）然后产物希夫碱被水解。

酶如何有选择地打断氨基酸底物的  $\alpha$ -碳原子上的三个键中的一个呢？一条重要的原理就是被打断的键必须与电子库的  $\pi$ -轨道垂直。例如，在转氨酶中，这是由与氨基酸底物的结合而完成的，结合使得 C—H 键与 PLP 环相垂直。在几种可能的催化结果中选择一种的这一方式称为立体电子控制（stereoelectronic control）。

辅酶 B<sub>12</sub> 提供自由基，以催化与氢有关的分子内的迁移

钴胺酶类催化三种类型的反应：（1）分子内重排；（2）甲基化作用，如甲硫氨酸合成中的反应；（3）核糖核苷酸还原为脱氧核糖核苷酸的反应。在哺乳动物中，依赖于辅酶 B<sub>12</sub> 的已知反应只有两种：L-甲基丙二酰 CoA 转变为琥珀酰 CoA（分子内重排）和高半胱氨酸甲基化而形成甲硫氨酸。

由辅酶 B<sub>12</sub> 所催化的重排反应是连在相邻的碳原子上的两个基团的相互交换：

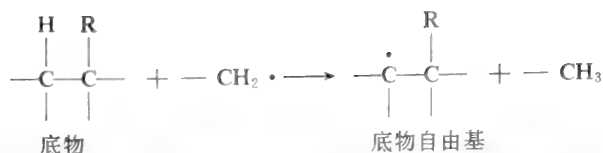


一个氢原子从一个碳原子上迁移至下一个碳原子上，而一个 X 基团（例如甲基丙二酰 CoA 的 —CO—S—CoA 基团）则以相反的方向同时迁移。这种分子内重排的第一步是 5'-脱氧腺苷基钴氨中的碳—钴键裂解，以形成 B<sub>12r</sub> (Co<sup>2+</sup>) 和一个 5'-脱氧腺苷基的自由基（—CH<sub>2</sub>·）：



在这种均匀裂解反应（homolytic cleavage reaction）中，Co—C 键的一个电子在 Co 一边，另一个电子在 C 一边，产生一个自由基。生物体系中的差不多所有其他裂解反应均与此相反，都是不均匀的（heterolytic）——一对电子被传递至原来成键的两个原子中的一个。

为什么要形成这种不寻常的 —CH<sub>2</sub>· 自由基呢？这种活性极高的基团从底物汲取一个氢原子而形成 5'-脱氧腺苷（—CH<sub>3</sub>）和一个底物自由基：



这就为 X 的迁移提供了舞台，X 将迁移到 H 原来所占据的相邻的碳原子上去。最后，产物自由基从 5'-甲基汲取一个氢原子，以完成重排反应，并使脱氧腺苷基单位变回为自由基形式（图 III-21-18）。在这种分子内的迁移中 B<sub>12</sub> 的作用是作为自由基的来源供汲取氢原子之用。

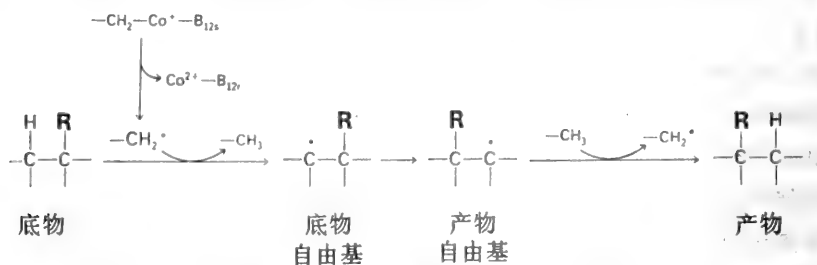


图 III-21-18 辅酶 B<sub>12</sub> 所提供的自由基在重排反应中吸引氢原子。

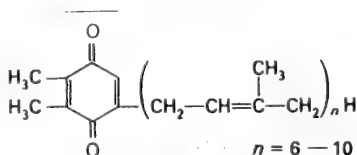
辅酶 B<sub>12</sub> 的关键特性就是其中 Co—C 键很微弱，极易发生断裂而产生自由基。钴原子周围，上下左右都挤满了，这使得它不能形成更强的键，否则这种辅酶就会是效率较低的催化剂了。



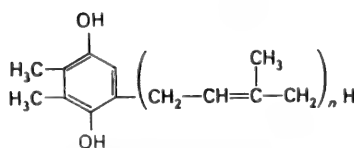
## 第22章 光合作用

### 光系统 II 把电子从水传递至质体醌

光系统 II 是由 10 条以上多肽链组成的跨膜的组装体 ( $>600\text{kd}$ )，它催化光所推动的由水至质体醌的电子传递。质体醌这一电子受体与泛醌极为相似，泛醌是线粒体的电子传递链中的一个组分。质体醌在氧化型 (Q) 与还原型 ( $\text{QH}_2$ ) 之间循环。

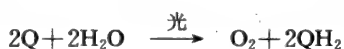


质体醌(氧化型, Q)



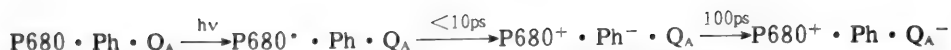
质体醌(还原型,  $\text{QH}_2$ )

这两个电子的还原反应的中间产物是一自由基半醌 ( $\text{QH}\cdot$ )。光系统 II 所催化的净反应是：



$\text{QH}_2$  中的电子比水中的电势高。回忆一下，氧化磷酸化中电子是从还原型泛醌流向  $\text{O}_2$ ，而不是相反的方向。光系统 II 推动的是热力学上的上山方向反应，利用的是光的自由能。

光系统 II 由集光复合物、带有作用中心的核心和放氧复合物组成。集光复合物 (LHC II) 含有 200 个左右叶绿素  $a$  和  $b$  的分子，结合在几条多肽链上。核心含有另外 50 个结合态的叶绿素  $a$ 。电子激发能从这些天线叶绿素集中到称为 P680 (P 代表色素，680 代表最大吸收光的波长，单位为 nm) 的作用中心叶绿素。这一作用中心的激发态  $\text{P680}^*$  是比基态强得多的还原剂。在激发后的皮秒 ( $10^{-12}$  秒) 范围内，一个电子就从  $\text{P680}^*$  被传递到结合态的去镁叶绿素 (Ph)，这是和叶绿素  $a$  一样的叶啉，只是没有 Mg。作用中心于是变成一正离子自由基  $\text{P680}^+$ 。在这一电荷分离过程中大部分被吸收的光子的能量发生了转化。



电子然后由还原型去镁叶绿素到达结合在称为  $\text{Q}_A$  的蛋白质部位上的质体醌，最后又到达部位  $\text{Q}_B$  上的第二个质体醌。 $\text{Q}_A$  上的质体醌反过来又从还原型去镁叶绿素接受一个电子并把它给予  $\text{Q}_B$ ，在整个循环中  $\text{Q}_A$  上的醌和自由基阴离子一直结合在蛋白质上。与此相反，在接受第一个电子时， $\text{Q}_B$  停留在 32kd 蛋白上，但在接受第二个电子后就被释放到膜的疏水区中去了。此刻两个光子的能量已经安全地贮藏到  $\text{QH}_2$  的还原势中去了。即将讨论到， $\text{QH}_2$  将其电子供给一个泵出质子的电子传递链，此链是联到光系统 I 上的。

在从水中汲取电子给  $\text{O}_2$  方面，锰离子起关键作用

在原初电荷分离步骤中由光系统 II 所形成的  $\text{P680}^+$  正离子是强氧化剂。 $\text{P680}^+$  (通过称为 Z 的中间产物) 从水汲取电子，导致  $\text{O}_2$  的形成。分解水的酶是光系统 II 的一个组分，它的催化中心含有 4 个集在一起的锰原子。这种 Mn 的复合物被  $\text{P680}^+$  氧化，形成一系列的 5 种氧化状态 (图 III-22-11)。最低的氧化状态 ( $\text{S}_0$ ,  $\text{S}_1$  和  $\text{S}_2$ ) 大概呈立体烷 (cubane) 的类似结构，有 4 个结合的氧原子。然后它接受 2 个水分子，并重排成  $\text{S}_3$ 。 $\text{S}_3$  具有类似金刚烷 (adamantane) 的结构，有 6 个结合的氧，再丢失一个电子即产生  $\text{S}_4$ 。 $\text{S}_4$  重排形成  $\text{S}_0$ ， $\text{O}_2$  则离去。Mn 离子中的电子传递到  $\text{P680}^+$ ，于是它缺少电子，这又引发了  $\text{S}_2$  吸收  $\text{OH}^-$  离子和  $\text{S}_4$

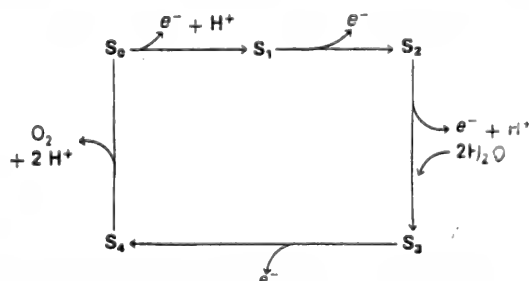


图 III-22-11 由光系统 II 的锰中心分解水的电荷累积器模型。 $\text{P680}^+$  顺序抽走 4 个电子推动了来自 2 个水分子的  $\text{O}_2$  的形成。每一循环释放 4 个  $\text{H}^+$ 。

释放  $\text{O}_2$ 。这一 Mn 中心起着电荷累积器 (charge accumulator) 的作用，它使得  $\text{O}_2$  能够形成，而不形成有害的部分还原的中间产物。回忆一下，细胞色素氧化酶由于使用了  $\text{Fe}^{2+} - \text{Cu}^+$  中心而解决了类似的问题。

从  $\text{H}_2\text{O}$  到  $\text{QH}_2$  的电子流的能力学和途径如图 III-22-13 所示，是以氧还电势来表示的。 $\text{QH}_2$  的电势 (0.1V) 比水的 (0.82V) 高，这说明  $\text{QH}_2$  是较强的还原剂。这一上山的电子传递是利用光系统 II 所吸收的光子的能量而完成的。680nm 的光子，其能量为 1.82 电子伏 (eV)，这足以在标准状况下把一个电子的电势改变 0.72V (从 0.82 到 0.1) 而有余。

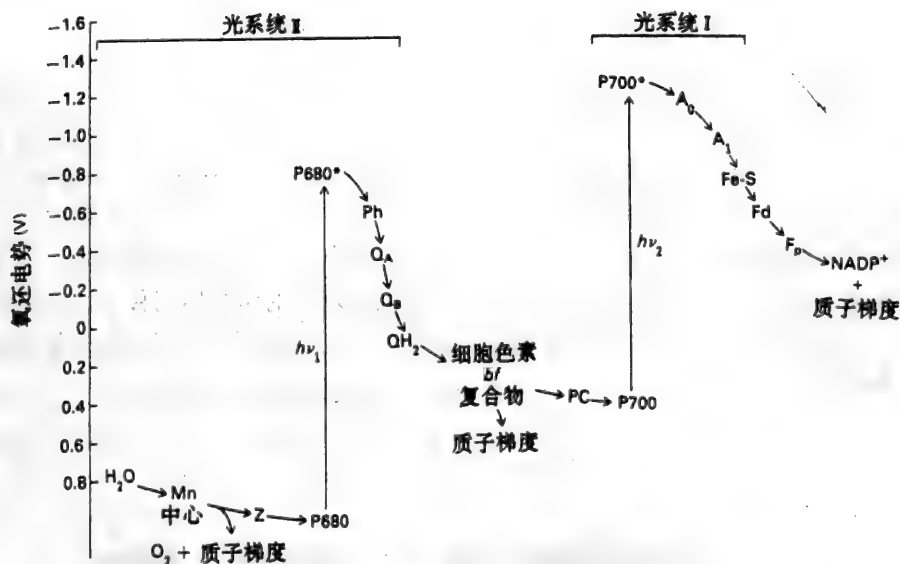


图 22-13 光合作用中由  $H_2O$  到  $NADP^+$  的电子流途径。这一吸能反应之所以能够进行，是因为光系统 II (P680) 和光系统 I (P700) 吸收了光。由光系统 II 所形成的还原型质体醌 ( $PQH_2$ ) 向细胞色素  $b_6/f$  复合物输送电子。还原型质体蓝素 (PC) 把电子带给光系统 I，它则产生还原型铁氧还蛋白 (Fd)。这一强还原剂将其电子传递给  $NADP^+$ ，形成  $NADPH$ 。当电子流过细胞色素  $b_6/f$  复合物时形成了跨类囊体膜的质子梯度 (内侧酸性)。在类囊体膜两侧分别发生的水的分解和  $NADP^+$  的还原也对质子梯度的形成有贡献。所用其他缩写为：Z，Mn 中心与 P680 之间的中间产物；Ph，去镁叶绿素； $Q_A$  和  $Q_B$ ，与质体醌结合的蛋白质； $A_0$  和  $A_1$ ，来自 P700\* 的电子的受体；Fp，黄素蛋白 (铁氧还蛋白- $NADP^+$  还原酶)。  
[据 R. E. Blankenship and R. C. Prince. *Trends Biochem. Sci.* 10 (1985); 383.]

## 叶绿体的 ATP 合酶与细菌和线粒体的类似

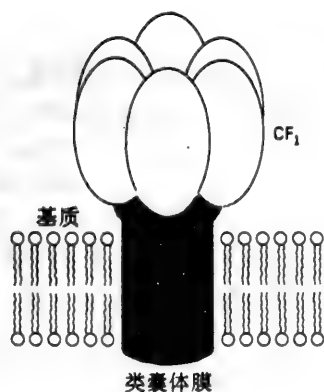


图 22-17 叶绿体的 ATP 合酶示意图。这种组装由跨膜的  $CF_0$  单位和在类囊体膜基质侧上的起催化作用的  $CF_1$  单位组成。

(上略)  $CF_0$  由至少 3 种亚基组成，是质子通过类囊体膜的通道。质子通道大概是由 8kd 链的六聚体组成的。 $CF_1$  和  $F_1$  一样，催化 ADP 和  $P_i$  形成 ATP。类囊体膜外表面上的小球是 ATP 合酶的  $CF_1$  单位 (图 22-17)。

$CF_1$  的亚基组成为  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 。 $\alpha$  和  $\beta$  亚基包括 ATP 和 ADP 的结合部位和催化部位。 $\delta$  亚基把  $CF_1$  结合到  $CF_0$  上， $\gamma$  亚基则控制质子流。 $\epsilon$  亚基在暗中抑制此复合物的催化活性，以阻断 ATP 水解所造成的浪费。(下略)。

## 光系统 I 和 ATP 合酶位于非垛叠的类囊体膜中

大多数植物的类囊体膜均分化为垛叠的 (stacked, 即紧贴的, appressed) 和非垛叠的 (unstacked, 即非紧贴的, nonappressed) 两种区域。垛叠使得一定体积内类囊体膜的量增多。这两种区域都围绕着一个共同的类囊体的内部空间, 但只有非垛叠的区域与叶绿体基质直接接触。垛叠的和非垛叠的区域在所含的光合组装体上有区别。光系统 I 和 ATP 合酶差不多仅位于非垛叠区域中, 而光系统 II 则主要位于垛叠区域中。细胞色素 *bf* 复合物分布均匀。质体醌和质体蓝素是可移动的电子载体, 在位于类囊体膜不同区域中的组装体间移动。共同的类囊体的内空间使得垛叠膜中光系统 II 所释放的质子能被 ATP 合酶分子所利用, 这些分子在非垛叠的膜中, 距离很远。

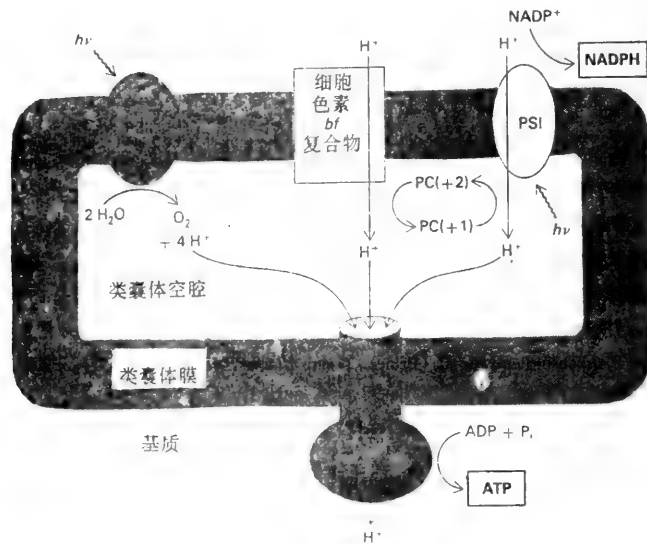


图 22-19 类囊体膜中光系统 I 和 II, 细胞色素 *bf* 复合物和 ATP 合酶的有方向的排列。

光所引起的质子的泵动使内部空间变酸。质子通过  $CF_1$  流至基质侧导致  $CF_1$  合成 ATP。NADPH 也在基质侧形成。[F. M. Harold, *The Vital Force: A Study of Bioenergetics* (W. H. Freeman, 1986), p. 271.]

类囊体膜系统的这种侧向分化有什么功能上的意义呢? 如果两个光系统都以高密度存在于膜的同一区域内, 那么光系统 II 所吸收的光子将有很大部分被传递给光系统 I, 因为 II 的激发态 ( $P680^*$ ) 高出于其基态 ( $P680$ ) 的能量水平, 比 I 的 ( $P700^*$ 高出于  $P700$  的) 要高得多。光系统的侧向分离——把  $P680^*$  放在距  $P700$  超过  $100\text{\AA}$  以外, 解决了这个问题。ATP 合酶似乎也是位于非垛叠区中, 以便大的球状的  $CF_1$  有足够的空间, 并易于接触到 ADP。与此相反, 紧贴区域中紧凑的部分不会给光系统 II 带来什么问题, 因为它是与小的极性电子供体 ( $H_2O$ ) 和脂溶性极强的电子载体 (质体醌) 相互作用。

垛叠的程度和不同的光合组装体的比例是受到调节的, 故能适应于环境的变化, 例如入

射光的强度和光谱特性。集光色素复合物Ⅱ(LHCⅡ)的侧向分布是由可逆的磷酸化作用控制的:光水平低时,LHCⅡ结合在光系统Ⅱ上;在光水平高时,一种专一的激酶被还原型质体醌所活化,于是LHCⅡ的苏氨酸侧链被磷酸化,使之从光系统Ⅱ上被释放出来。这种集光单位的磷酸化的形式在类囊体膜中自由扩散,因而可能与光系统Ⅰ联合而增加其吸收系数。磷酸化作用也可能起到标记LHCⅡ,以使之降解的作用。

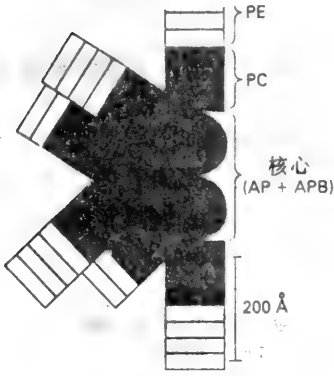
### 在蓝细菌和红藻中藻胆素体起分子光管的作用

很少蓝光和红光能到达生长在海水中一米以下或更深处的藻类,因为光被水和其上的生物体内的叶绿素吸收了。蓝细菌(蓝绿藻)和红藻含有称为藻胆素体的蛋白质组装体,这些组装体使得藻类能够吸收透过来的绿光和黄光。藻胆素体结合在类囊体膜的外表面上,起着吸光天线的作用,把激发能集中到光系统Ⅱ的作用中心内。它们的最大吸收在470和650nm区,在叶绿素a的蓝光和远红光的吸收高峰间的低谷内。藻胆素体是许多藻胆蛋白亚基的很大的组装体(数百万道尔顿),每一亚基含有许多共价连接的后胆色素(bilin)辅基和几条与辅基相连的多肽。藻胆素体含有数百个后胆色素。藻蓝素和藻红素就是两个最常见的。

藻胆素体吸收的光谱区域很宽,因为它们含有好几种光谱性质不同的藻胆蛋白。最大吸收在短波范围的藻胆蛋白所收集的光能会传到吸收高峰在长波范围的藻胆蛋白,然后传递到光系统Ⅱ的作用中心叶绿素。能量是由直接的电磁相互作用而传递的,这种相互作用要求能量受体的吸收光谱与能量供体的发射光谱之间有交盖。远离多至70Å的相互配合良好的供体和受体之间都能够有效地传递能量。例如,在蓝绿藻的藻胆素体中,激发能按下列顺序从一种藻胆蛋白传至另一种:

藻红素→藻蓝素→别藻蓝素→作用中心

藻胆素体中藻胆蛋白的几何排列(图Ⅲ-22-22)以及这些蛋白的光谱特性造成了能量传递的大于95%的效率。在这些天线外周的藻红素亚基所吸收的激发能在不到100皮秒的时间内就在作用中心出现。藻胆素体是设计得出色的光管,它使得藻类存在于这样的生态环境中,这种环境本来是不能维持那些仅仅依靠叶绿素捕获光的生物的生存的。



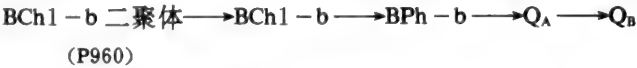
图Ⅲ-22-22 蓝细菌 *Synechocystis* 6701 的藻胆体示意图。含有藻红素(PE)和藻蓝素(PC)的杆状物从核心处伸出。核心由别藻蓝素(AP)和别藻蓝素B(APB)组成。核心区结合在类囊体膜上。

### 一种光合作用中心的结构已在原子水平上被阐明

根据戴森霍弗(J. Deisenhofer)、米歇尔(H. Michel)和胡伯尔(R. Huber)的X射线结晶学分析,最近已对一种紫色硫细菌 *Rhodospseudomonas viridis* 的光合作用中心在原子水平上作了阐明。作用中心由4种多肽键组成:L(31kd)、M(36kd)和H(28kd)亚基和一种c类型的细胞色素。细胞色素位于类囊体膜的一侧,大部分H亚基在另一侧。L和M亚基非常相像;每一个都有5

个跨膜的  $\alpha$ -螺旋而与 H 亚基不同, H 亚基只有一个跨膜的螺旋。这些螺旋肽段的大多数侧链都是疏水的。

细胞色素含有 4 个共价联接的血红素基团。4 个细菌叶绿素 b 分子(BChl-b), 2 个去镁细菌叶绿素分子(BPh-b), 2 个醌( $Q_A$  和  $Q_B$ )和一个亚铁离子以非共价键与 L 和 M 亚基联合。细菌叶绿素与叶绿素类似, 只是有少量的修饰, 使得其吸收高峰偏移到了近红外区, 到了长达 1000nm 的波长。在 *R. viridis* 中, 作用中心是 BChl-b 的二聚体, 其最大吸收在 960nm。实际上, 所有已知的作用中心都是叶绿素衍生物的二聚体。另一个重复出现的主题就是作用中心的激发导致电荷分离。在此情况下, 电子通过一系列的受体由细菌叶绿素的二聚体传到  $Q_B$ :



细胞色素亚基的血红素则提供电子使  $P960^+$  回到基态。

正如在绿色植物的光系统 II 中一样,  $Q_A$  是牢固结合的, 而  $Q_B$  则在第二个电子到达时以  $QH_2$  的形式被释放。事实上, 紫色细菌的作用中心与光系统 II 的极为相似。这种细菌的作用中心三维结构的阐明, 极有助于洞察膜本体蛋白的结构、光合作用的原初过程以及光合组装体的进化关系。

### CO<sub>2</sub> 与核酮糖 1,5-二磷酸反应形成二分子 3-磷酸甘油酸

(上略) CO<sub>2</sub> 分子与核酮糖 1,5-二磷酸缩合形成一过渡的六碳化合物, 它迅即水解为两

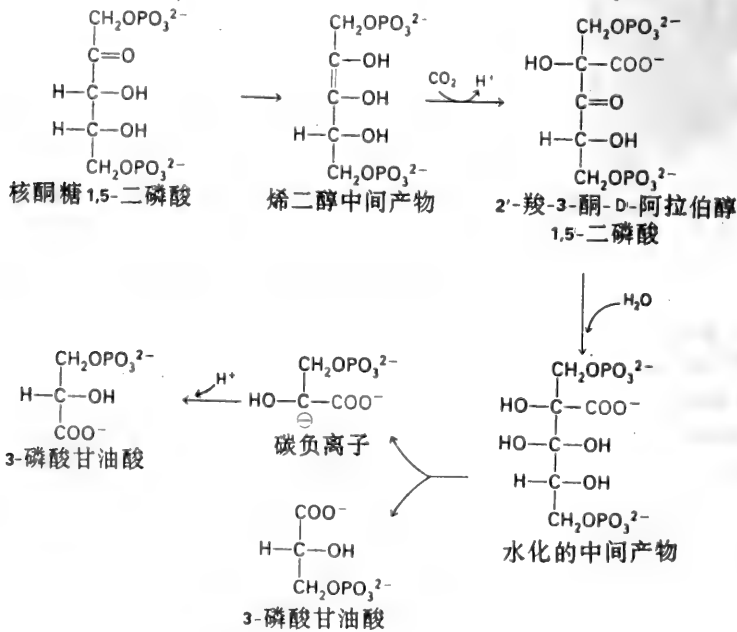
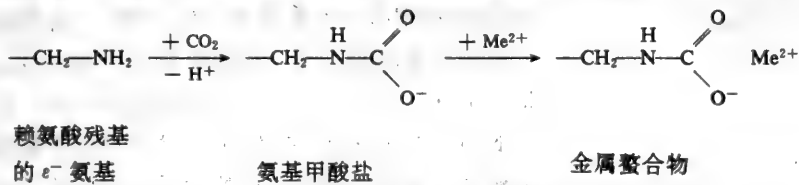


图 II-22-26 核酮糖 1,5-二磷酸所催化的固碳反应。

分子 3-磷酸甘油酸 (图 III-22-26)。这一高度放能的反应 ( $\Delta G^{\circ} = -12.4$  千卡/摩尔) 是由核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 (亦称 Rubisco) 催化的, 这是位于类囊体膜的基质表面上的酶。叶绿体中的这种酶由 8 个大亚基 (L, 56kd) 和 8 个小亚基 (S, 14kd) 组成。每一条 L 链含有一个催化部位和一个调节部位。S 链的作用不明。此酶在叶绿体中非常多, 占其总蛋白量的 60% 以上 (原书为 16%, 有误——译者)。事实上, Rubisco 大概是生物圈中最丰富的蛋白质。

此羧化酶所催化的反应, 第一步是形成一烯二醇中间产物, 它然后与  $\text{CO}_2$  反应产生一六碳中间产物, 即 2'-羧-3-酮基-D-阿拉伯醇 1,5-二磷酸。这一  $\text{C}_6$  化合物的水化产生一在 C-3 上的二醇。C-C 键的裂解产生一分子 3-磷酸甘油酸和另一磷酸甘油酸的负碳离子。这一负碳离子的质子化, 即形成第二个 3-磷酸甘油酸分子。

由于向专一的赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基上加入  $\text{CO}_2$  而形成氨基甲酸盐, 此酶被转变成有催化活性的形式。这一带负电荷的加成物然后与一二价金属离子 ( $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$ ) 结合, 形成一带正电荷的中心。十分可能的是, 这一与酶结合的金属离子在催化过程中起着电子库的作用。



紫色红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*), 一种紫色细菌的这种羧化酶的三维结构, 最近已以高分辨率被阐明了。此酶为相同亚基的二聚体, 此亚基类似植物的 L 亚基。细菌的这种酶也是由于形成与金属结合的氨基甲酸盐而被活化, 并且其酶促机理也与叶绿体中的这种酶的相同。羧化酶的每一亚基都是二裂的。含有活性部位的较大的羧基末端结构域形如琵琶状桶。形成桶的核心的 8 条平行的  $\beta$  链为 8 个  $\alpha$ -螺旋所围绕。在一些功能上和进化上与之无关的酶, 如丙糖磷酸脱氢酶和丙酮酸激酶中也存在这种特点。每一亚基上的活性部位在桶的核心的羧基端一侧。

### 核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶也催化与之相竞争的加氧酶反应

核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶也是加氧酶。它催化  $\text{O}_2$  与核酮糖 1,5-二磷酸的加成, 形成磷酸乙醇酸和 3-磷酸甘油酸 (图 III-22-28)。加氧酶和羧化酶的反应是由同一活性部位所进行

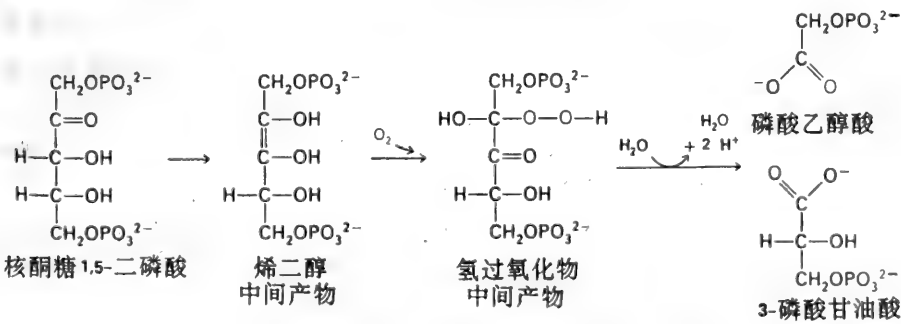


图 III-22-28 由核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶所催化的加氧酶反应。

的,而且相互竞争。在 25℃ 和正常的大气条件下,羧化反应的速率为加氧反应速率的 4 倍;这时基质中  $\text{CO}_2$  的浓度为  $10\mu\text{M}$ ,而  $\text{O}_2$  的为  $250\mu\text{M}$ 。加氧酶反应也和羧化酶反应一样,要求同一赖氨酸呈氨基甲酸的形式,并有一结合的 二价金属离子。

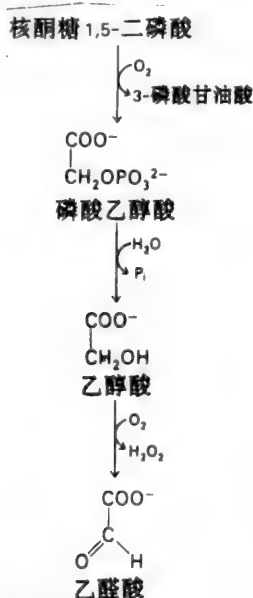


图 III-22-29 乙醇酸的形成和分解。

磷酸甘油酸不是一种易于发生变化的代谢物。有一种补救途径能回收其部分碳架(图 III-22-29)。专一的磷酸酶把它转变为乙醇酸,乙醇酸再进入过氧化酶体(peroxisome),亦称微体(microbody)。乙醇酸被乙醇酸氧化酶氧化为乙醛酸。这一反应所产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  被过氧化氢酶裂解为  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ 。然后乙醛酸的转氨作用产生甘氨酸。在线粒体中,由两分子甘氨酸形成丝氨酸,释放  $\text{CO}_2$  和  $\text{NH}_3$ 。

这一途径是使两分子乙醇酸的 4 个碳原子中的 3 个发生再循环。不过,其中一个以  $\text{CO}_2$  的形式丢失,而转氨作用所供应的两个氨基中的一个以  $\text{NH}_4^+$  的形式丢失。这一过程称为光呼吸,因为它消耗  $\text{O}_2$  而释放  $\text{CO}_2$ 。光呼吸似乎是一浪费过程,因为有机碳被转变成  $\text{CO}_2$ ,而不产生 ATP 或 NADPH,或有其它明显的收益。这似乎是核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶不完善所造成的后果。人们花了许多力气进行生物工程的工作,以期获得加氧酶活性低于天然存在的酶的羧化酶。叶绿体酶的基因已被克隆,并在大肠杆菌中表达,正在进行定位突变。这一赌注很大,因为假若光呼吸

被阻止,作物产量会显著增加。有兴趣的是看一看,自然所设计的固定  $\text{CO}_2$  的酶是否能在实验室被改进。

## 在协调光合作用的光反应和暗反应方面,硫氧还蛋白起作用

只有当光合作用的光反应产生 ATP 和 NADPH 时,卡尔文循环才运转。这一循环的几种酶是因二硫键的还原而被活化的。还原剂为硫氧还蛋白(thioredoxin),含有彼此相邻的半胱氨酸残基的 12kd 的蛋白质。这两个半胱氨酸在氧化型硫氧还蛋白中形成二硫键。在叶绿体中,氧化型硫氧还蛋白为铁氧还蛋白所还原。这样,通过铁氧还蛋白的还原势,而后是硫氧还蛋白的还原势,光合作用的光反应和暗反应的活性就协调了。例如,磷酸核酮糖激酶的催化活性在光下就增加 100 倍。当我们讨论核糖核苷酸的还原时,还要谈到硫氧还蛋白。

卡尔文循环中的限速步骤是核酮糖 1,5-二磷酸羧化而形成两分子 3-磷酸甘油酸的反应。核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶的活性在照光时显著增加。在基质中, pH 由 7 增至 8,  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度也增高。这两种效应都是质子被泵入类囊体空间的结果。在这些条件下羧化酶活性提高,因为碱性 pH 有利于氨基甲酸盐的形成。 $\text{CO}_2$  加在起调节作用的去质子化的  $\epsilon$ -氨基上,  $\text{Mg}^{2+}$  则与氨基甲酸盐结合形成一加成物,这是催化作用所必需的。



## 概 要

绿色植物的光合作用是由位于叶绿体的类囊体膜中的两个光系统所推动的。照光引起：(1) 产生一跨膜的质子梯度以形成 ATP 和 (2) 产生还原能力以形成 NADPH。光系统 II 的集光色素复合物中的叶绿素所吸收的光被集中到作用中心 P680 处。一个电子从激发的  $P680^*$  传递到去镁叶绿素，然后又传递到连在  $Q_A$  和  $Q_B$  上的质体醌以形成还原型质体醌 ( $QH_2$ )。通过含锰蛋白的作用，作用中心重新由水获得电子，于是引起  $O_2$  的释放。这样，光系统 II 所催化的净反应是光所引起的电子由水到质体醌的传递。所有光合作用中心上所发生的关键性变化都是光所引起的。逆着电势梯度的电子向一个受体的传递。

来自光系统 II 的电子又通过细胞色素  $b-f$  复合物流向光系统 I。当电子从  $QH_2$  传递至质体蓝素（一种水溶性蛋白质）时，这种跨膜复合物就将质子泵入类囊体的空腔内。光系统 I 的作用是引起光活化的电子由质体蓝素传递到铁氧还蛋白。铁氧还蛋白是强有力的还原剂。然后，位于膜的基质侧的一种黄蛋白，即铁氧还蛋白-NADP-还原酶，催化 NADPH 的形成。这样，光系统 I 和 II 的相互作用导致电子从  $H_2O$  传递至 NADPH 以及同时发生的质子梯度的产生，此梯度用于 ATP 的合成。另一种途径是，电子从铁氧还蛋白通过细胞色素  $b-f$  复合物流回到光系统 I；光系统 I 的这种作用方式称为循环光合磷酸化，它也导致质子梯度的产生，但不形成 NADPH。叶绿体的 ATP 合酶（也称为  $CF_0-CF_1$ ）与细菌和线粒体中的合成 ATP 的组装体 ( $F_0-F_1$ ) 极为相似。质子由类囊体空腔通过跨膜通道  $CF_0$  而流向膜的基质侧上的  $CF_1$ ，这就推动了 ATP 的合成。

（下略）。

## 第 23 章 膜脂和固醇激素的生物合成

缩醛磷脂和其它醚磷脂是由二羟丙酮磷酸形成的

有些磷脂在  $C_1$  含有醚单位，而不是酰基单位。甘油基醚磷脂是以二羟丙酮磷酸为起点而合成的（图 III-23-3）。由脂肪酸酰 CoA 进行的酰化作用产生 1-酰基衍生物，它又与一长链醇发生交换而形成  $C_1$  上的醚。 $C_2$  上的酮基被 NADPH 还原，所形成的醇又被一长链 CoA 所酰化。去掉 3-磷酸基产生 1-烷基-2-酰基甘油，它再与 CDP-胆碱反应产生相当于磷脂酰胆碱的醚类似物。

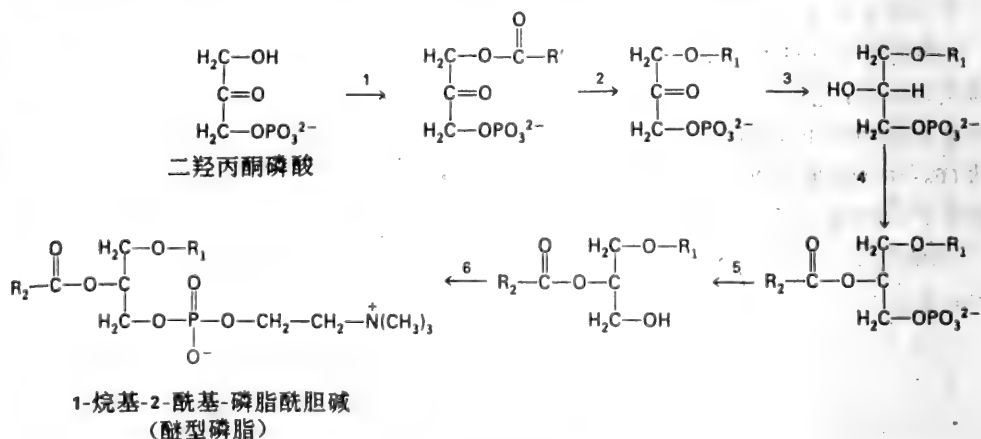
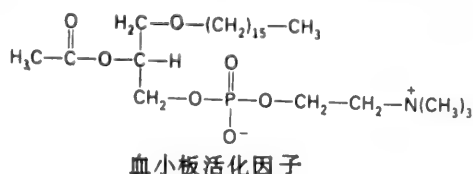


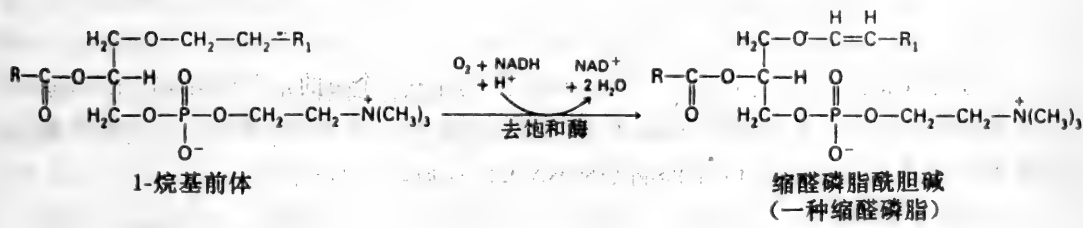
图 III-23-3 醚磷脂的形成。

步骤为：(1) 由脂肪酸酰 CoA 酰化，(2) 醇与羧基部分交换，(3) 被 NADPH 还原，(4) 被第二个酰基 CoA 酰化，(5) 磷酸酯水解，(6) 磷酸胆碱部分的转移。

最近鉴定出一种有惊人活性的醚磷脂。血小板活化因子 (platelet activating factor) 是磷脂酰胆碱的 1-烷基-2-乙酰基醚类似物。血液中即使非常低浓度 (0.1nM) 的这种化合物就会引起血小板的聚集和血管的舒张。 $C_2$  上存在乙酰基而不是长链酰基增加了这种脂的水溶性，使得它能在水环境中起作用。



缩醛磷脂是在 C<sub>1</sub> 上含有 α,β-不饱和醚的磷脂。缩醛磷脂酰胆碱是相当于磷脂酰胆碱的缩醛磷脂,它是由 1-烷基前体的去饱和化而形成的。在缩醛磷脂的合成中催化这最后一步的去饱和酶是一种微粒体的酶,类似于把双键引入到长链脂肪酰 CoA 类的酶;O<sub>2</sub> 和 NADH 是反应物,细胞色素 b<sub>5</sub> 参加催化作用。



### 胆固醇和其它脂类由脂蛋白转移到专一的靶位

胆固醇、三酰基甘油类和其它脂类是由脂蛋白在体液中转运的,根据其密度的增加,这些脂蛋白依次为(表Ⅲ-23-1):乳糜微粒、残留乳糜微粒、极低密度脂蛋白(VLDL)、中间密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。脂蛋白是一种颗粒,由疏水脂类的核心和围绕它的极性脂类及蛋白本体的壳组成。已分离并鉴定出了 7 种主要的蛋白本体——A-1, A-2, A-4, B-48, B-100, C 和 E。它们是由肝脏和小肠合成并分泌的。这些脂蛋白有双重作用:它们使高度疏水的脂类溶解,而且它们还含有一种信号,调节着特定脂类进出特定的靶子细胞和组织的移动。

从膳食中获得的三酰基甘油类、胆固醇和其它脂类被大的乳糜微粒(直径 80 至 500nm)由小肠携带至脂肪组织和肝脏。乳糜微粒的密度很低(<0.94g/cm<sup>3</sup>),因为它们富于三酰基甘油而且蛋白质含量低于 2%。乳糜微粒中的三酰基甘油类在几分钟内即为脂肪酶所水解,此酶位于脂肪组织和其它外周组织的毛细血管中,称为残留乳糜微粒的富含胆固醇的残留物则被肝脏吸收。

表Ⅲ-23-1 血浆脂蛋白的性质

脂 蛋 白	主要的核心脂类	蛋白本体	转送脂类的机理
乳糜微粒	膳食中的三酰基甘油	A-1, A-2, A-4, B-48	由脂蛋白脂肪酶水解
残留乳糜微粒	膳食中的胆固醇酯	B-48, E	由肝脏进行以受体为媒介的胞吞作用
极低密度脂蛋白(VLDL)	内源三酰基甘油	B-100, C, E	由脂蛋白脂肪酶水解
中间密度脂蛋白(IDL)	内源胆固醇酯	B-100, E	由肝脏进行以受体为媒介的胞吞作用并转变为 LDL
低密度脂蛋白(LDL)	内源胆固醇酯	B-100	由肝脏和其它组织进行以受体为媒介的胞吞作用
高密度脂蛋白(HDL)	内源胆固醇酯	A-1, A-2	将胆固醇酯转变为 IDL 和 LDL

内源合成的三酰基甘油类，与从膳食中获得的不同，是由主要为肝脏所产生的**极低密度脂蛋白**（VLDL）所携带的。由作用于乳糜微粒同样的脂肪酶使三酰基甘油类从这些脂蛋白中释放出来。所产生的残留物富含胆固醇的酯类，称为**中间密度脂蛋白**（IDL）。这些颗粒有两种命运：一半被肝脏所吸收，而另一半则转变为**低密度脂蛋白**（LDL），血液中胆固醇的主要载体。LDL的直径为22nm，质量约300万道尔顿。其核心为大约1500个酯化的胆固醇分子；这些酯中最普遍的脂肪酰链为亚油酸，一种多烯脂肪酸。这一高度疏水的核心为一外壳所包围，外壳由磷脂和未酯化的胆固醇所组成。外壳也含有一单拷贝的B-100，一种非常大的蛋白质（514kd）。LDL的作用是将胆固醇运至外周组织并调节这些部位胆固醇的从新合成，如下所述。**高密度脂蛋白**（HDL，密度 $>1.06\text{g/cm}^3$ ）担负着另一个目的，它收集死亡中的细胞向血浆中释放的胆固醇和来自转换中的膜的胆固醇。HDL中的酰基转移酶将这些胆固醇酯化，然后由一种转移蛋白迅速把它们运入VLDL或LDL。

## LDL受体是跨膜蛋白质，有5个不同的功能结构域

人的LDL受体的cDNA的克隆和顺序测定揭示出这种115kd的蛋白质由5个结构域组成。成熟受体的氨基末端结构域由40个残基的富于半胱氨酸的顺序组成，这一顺序共重复7次，稍有变化。这一**结合LDL的结构域**中的带负电荷的侧链集团与LDL的B-100蛋白质的带正电荷的部位相互作用。酸性核内体中受体的谷氨酸和天冬氨酸侧链的质子化导致LDL从其受体上释放出来。LDL受体的第二个结构域与表皮生长因子（EGF）前体的一部分同源。它含有两个与N连结的寡糖链。第二个结构域极富于丝氨酸和苏氨酸，含有与O连结的糖类。这些寡糖也像血型糖蛋白中的寡糖一样，起着支架的作用，使得受体从膜上张开，因而其氨基末端的结构域可以与LDL接触。第四个结构域含有22个疏水残基，它们跨越质膜。这一肽段大概是 $\alpha$ -螺旋，其长度正好横跨双分子层的疏水部分。第五个结构域由50个残基组成，伸出至膜的胞液侧，它在此处控制着受体与孔的相互作用并参与胞吞作用。

LDL受体的基因长45kb，由18个外显子组成，这与此蛋白质的结构单位极为吻合。与LDL结合的结构域中的几个富含半胱氨酸的重复肽段是由一单个的外显子编码的，这种外显子也存在于一整套级联体中一个组分的基因中。以下的8个外显子均存在于EGF前体的基因中。好象是从一个祖先基因中拿出了一盒放在EGF前体的基因和LDL受体基因中间。**LDL受体是一个令人注目的例子，它是由外显子的掺合而组装成的基因所编码的嵌合蛋白质。**

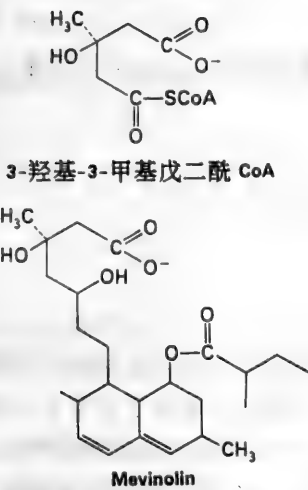
## 无LDL受体引起高胆固醇血和动脉粥样硬化

（上略）**家族高胆固醇血（FH）**大多数的分子缺陷是没有或缺少起作用的LDL的受体。纯合子几乎没有LDL受体，而杂合子大约有正常数量的一半。其结果，LDL之进入肝脏或其它细胞受阻，导致血浆中LDL水平的提高。其次，较少的IDL进入肝细胞，因为IDL的进入也是由LDL受体作媒介的（IDL和LDL一样含有B-100蛋白）。于是，与正常人相比，FH病人体内IDL在血液中停留的时间较长，而且有较多的IDL转变成LDL。LDL受体的缺失或缺乏所引起的全部有害的后果都能归之于血液中LDL胆固醇水平的提高。

已鉴定出几种FH突变：（1）不合成受体。（2）有受体合成，但受体不能到达质膜，因为

它们没有细胞间转运的信号或是折叠得不正常。(3)受体到达细胞表面,但不能正常地与 LDL 结合,因为与 LDL 结合的结构域有缺陷。(4)受体到达细胞表面并与 LDL 结合,但不能在小孔处聚集成簇,因为它们的羧基末端区有缺陷。

HMG CoA 还原酶的抑制剂 Mevinolin  
引起 LDL 受体数目的增多



图Ⅲ-23-23 Mevinolin 是 HMG CoA 还原酶的强有力的竞争性抑制剂,它与底物 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 类似。

纯合的 FH 可由移植入正常肝脏而治愈。对于杂合的 FH (500 人中有 1 个),有一种更为普遍适用的疗法。关键就是刺激单个的正常基因,使之产生比习惯上数目更多的 LDL 受体。培养的成纤维细胞的研究证明,LDL 受体的产生为细胞对胆固醇的需要所控制。当需要胆固醇时,LDL 受体的 mRNA 的量即增多,于是在细胞表面上就有较多的受体。抑制小肠对胆盐的再吸收(这促进膳食中胆固醇的吸收)以及阻断胆固醇的合成均可达到这种状态。胆盐的再吸收可用口服带正电荷的高分子来抑制,这些高分子与带负电荷的胆盐相结合,而它们本身又不被吸收。胆固醇的合成可用 Mevinolin 有效地阻断(图Ⅲ-23-23),它是 HMG CoA 还原酶的强有力的竞争性抑制剂( $K_i$ 为 1nM),此酶为生物合成途径中的关键性酶。由此而产生的肝细胞上 LDL 受体数目的增多使得血液中 LDL 的水平降低。事实上,使用这两种药物可使病人血浆中胆固醇的水平降低 50%。对于降低胆固醇的药物,人们有很大的兴趣,因为在工业化的社会中动脉粥样硬化是死亡的首要原因。

## 第 24 章 氨基酸和血红蛋白的生物合成

氨基酸是由柠檬酸循环和其它主要  
途径的中间产物合成的

(上略) 脲循环可合成足够的精氨酸以满足成年人的需要, 但大概不能满足正在生长的儿童的需要。(下略)。

谷胱甘肽是  $\gamma$ -谷氨酰肽, 起着硫氢基缓冲剂  
和氨基酸转运体的作用

谷胱甘肽是含有硫氢基的三肽, 是一种非常特殊的氨基酸衍生物, 有好几种重要的作用。例如, 谷胱甘肽保护红血球, 使免遭氧化性破坏。合成谷胱甘肽的第一步是在谷氨酸的  $\gamma$ -羧基与半胱氨酸的氨基之间形成肽键, 此反应由  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化 (图 24-20)。这一肽键要求  $\gamma$ -羧基的活化, 而这是由 ATP 来完成的。所产生的酰基磷酸中间产物再被半胱氨酸的氨基所攻击。这一反应为谷胱甘肽所反馈抑制。第二步是由谷胱甘肽合成酶所催化的, 在此步中 ATP 活化半胱氨酸的羧基, 使之能与甘氨酸的氨基缩合。

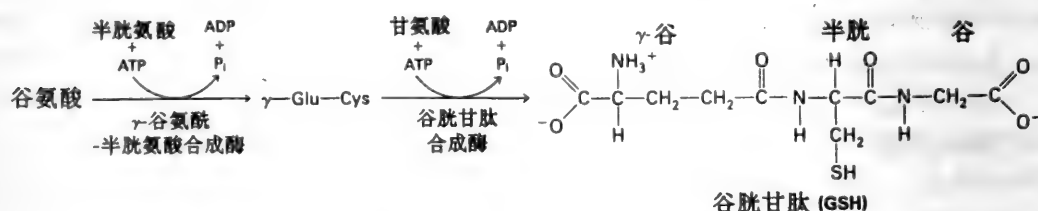
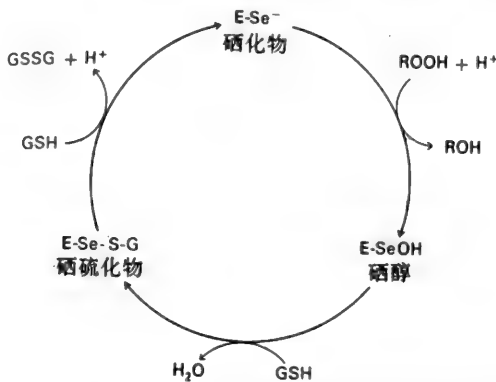


图 24-20 谷胱甘肽的合成。

在动物细胞中谷胱甘肽以高水平 ( $\sim 5\text{mM}$ ) 而存在, 起着硫氢基缓冲剂的作用。它在还原态硫醇型 (GSH) 与氧化型 (GSSG) 之间循环, 氧化型中两个三肽由二硫键连在一起。GSSG 为谷胱甘肽还原酶所还原, 此酶为黄素蛋白, 利用 NADPH 为电子来源。大多数细胞中 GSH 与 GSSG 之比大于 500。



谷胱甘肽在解毒中起关键作用，它与过氧化氢和有机过氧化物起作用，这些过氧化物是需氧生活的有害的副产物。

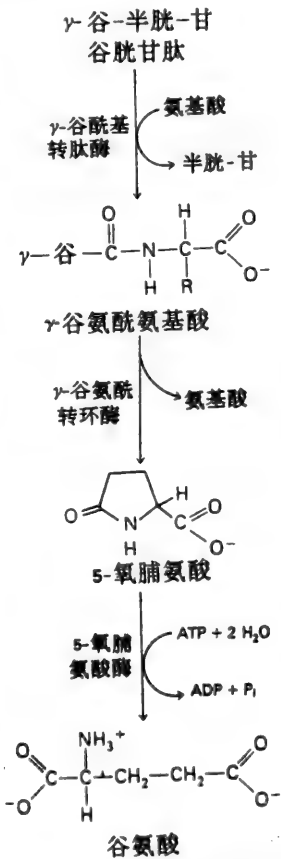


图Ⅲ-24-22 谷胱甘肽过氧化物酶可能的催化机理。

[根据 O. Epp, R. Ladenstein, and A. Wendel. *Eur. J. Biochem.* 133(1983):51.]

谷胱甘肽过氧化物酶是催化这一反应的酶，其显著特点是有一共价结合的硒(Se)原子。其活性部位含有半胱氨酸的硒类似物，Se 取代了 S。这一残基的硒化物 (E-Se-) 形式将底物过氧化物还原为醇，它本身又被氧化为硒酸 (E-Se-OH) (图Ⅲ-24-22)。谷胱甘肽现在形成一加成物，硒硫化物 (E-Se-S-G)，而参加反应。然后第二个谷胱甘肽攻击硒硫化物而形成氧化型谷胱甘肽，于是此酶的活化形式就再生出来了。

谷胱甘肽也参与氨基酸的转运。一种与膜结合的酶， $\gamma$ -谷氨酰转肽酶，催化谷胱甘肽上的  $\gamma$ -谷氨酰基转移至受体氨基酸如半胱氨酸或谷酰胺的  $\alpha$ -氨基上的反应 (图Ⅲ-24-23)。此酶的催化部位位于肾细胞的质膜的胞外侧。谷胱甘肽被运过质膜，以进行此反应。然后  $\gamma$ -谷氨酰氨基酸被别的器官的细胞所吸收，并环化成 5-氧脯氨酸，被转运的氨基酸则被释放出来。最后，5-氧脯氨酸的肽键被水解，此水解反应需要 ATP，并再生谷氨酸。麦斯特尔 (A. Meister) 证明这些反应形成一  $\gamma$ -谷氨酰循环 (图Ⅲ-24-24)。



图Ⅲ-24-23 在氨基酸的转运过程中，谷胱甘肽转变为谷氨酸。

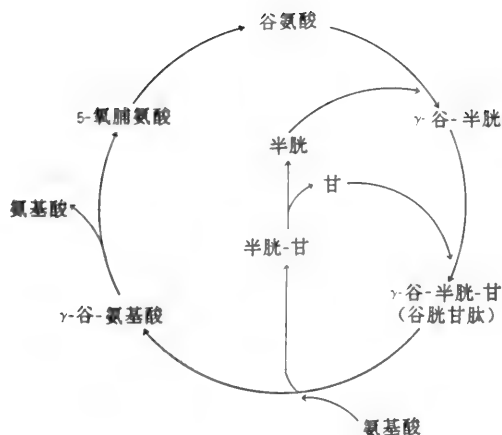


图 24-24  $\gamma$ -谷氨酰循环。

氨基酸以  $\gamma$ -谷氨酰衍生物的形式从一个细胞被运至另一细胞。此循环的全部反应均在细胞的胞液中进行，但  $\gamma$ -谷氨酰氨基酸的形成除外，它在质膜的胞外表面上发生。

## 胆绿素和胆红素是血红素分解的中间产物

(上略) 胆红素在水介质中的溶解度比胆绿素的小得多。在爬虫类和鸟类中，血红素分解代谢的最终产物是胆绿素，而不是胆红素。为什么哺乳动物把胆绿素还原成胆红素这种带来溶解度问题的化合物呢？近年的研究证明，**胆红素是非常有效的抗氧化剂**，而胆绿素则否。在清除两个氢过氧化物自由基时，胆红素被氧化成胆绿素，胆绿素又迅速被还原，再形成胆红素。按分子计，结合在清蛋白上的胆红素在起保护作用使免受水溶性过氧化物为害的效率约为抗坏血酸（维生素 C）的十分之一。胆红素、尿酸和抗坏血酸是血浆中三种主要的抗氧化剂。在膜中，胆红素是非常强的抗氧化剂，在这方面可与维生素 E 相匹敌。这些研究说明，在进化过程中可能对降解途径的最终产物进行了选择，以使它们起到有利的作用。

## 概 要

微生物利用 ATP 和还原型的铁氧还蛋白将  $N_2$  转变为  $NH_4^+$ 。高等生物利用  $NH_4^+$  以合成氨基酸、核苷酸和其他含氮的生物分子。 $NH_4^+$  参与代谢的主要入口是谷酰胺、谷氨酸和氨甲酰磷酸。人能够合成基本的 20 种氨基酸中的 11 种。这些氨基酸称为非必需的，以区别于那些必需的，即必须由膳食中供应的氨基酸。非必需氨基酸的合成途径十分简单。谷氨酸脱氢酶催化  $\alpha$ -酮戊二酸的还原性氨化作用，形成谷氨酸。丙氨酸和天冬氨酸分别由丙酮酸和草酰乙酸的转氨作用合成。谷酰胺由  $NH_4^+$  与谷氨酸合成，天冬酰胺的合成也类似。脯氨酸和精氨酸由谷氨酸衍生而来。由 3-磷酸甘油酸形成的丝氨酸是甘氨酸和半胱氨酸的前体。酪氨酸是由必需的氨基酸苯丙氨酸的羟基化作用而形成的。必需氨基酸的合成途径比非必需氨基酸的复杂得多。这些途径中大多数是由反馈抑制调节的，关键步骤受到最终产物的变构性抑制。

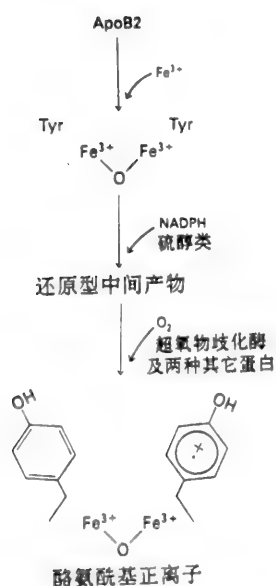


四氢叶酸在氨基酸和核苷酸的代谢中起着重要作用。这种辅酶携带处于 3 种氧化状态的一碳单位：最还原的——甲基；居间的——亚甲基；最氧化的——甲酰基，亚胺甲基和甲川基。活化的甲基的主要供体是 S-腺苷基甲硫氨酸，这是由于 ATP 上的腺苷基转移到甲硫氨酸的硫原子上而合成的。当活化的甲基被传递到受体上时则形成 S-腺苷基高半胱氨酸。后者又被水解为腺苷和高半胱氨酸，高半胱氨酸再被甲基化为甲硫氨酸，从而完成了活化甲基的循环。

氨基酸是许多种生物分子的前体。谷胱甘肽 ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) 起着硫氢基缓冲剂、氨基酸转运体和解毒剂的作用。谷胱甘肽过氧化物酶是一种含硒的酶，它催化谷胱甘肽还原过氧化氢和有机过氧化物的作用。卟啉类是由甘氨酸与琥珀酰 CoA 合成的，此二者缩合为  $\delta$ -氨基戊酮酸。这种中间产物彼此缩合形成胆色素原。4 个胆色素原合为一个线状的四吡咯，它又环化形成尿卟啉原 III。氧化和侧链的修饰导致原卟啉 IX 的合成，原卟啉 IX 获得一个铁原子即成为血红蛋白。这一辅基为单氧合酶所降解，将其转变为线状的四吡咯，即胆绿素。NADPH 还原胆绿素，产生胆红素，这是过氧化物的有效的清除剂。胆红素形成二糖醛酸衍生物即变为可溶性的，这有利于其排泄。

## 第 25 章 核苷酸的生物合成

### 核糖核苷酸还原酶在其活性部位上含有自由基



剂，酶活性即消失，就是明证。B2 中的自由基被一铁中心所稳定化，铁中心有 2 个  $\text{Fe}^{3+}$  离子，被一氧原子连在一起。在 8-羟基喹啉（高铁离子的螯合剂）存在下被透析时，B2 既失去其铁中心，也失去其自由基。在  $\text{O}_2$  和一种硫醇存在下，由蛋白本体和  $\text{Fe}^{3+}$  可形成有活性的 B2。催化自由基的再生并恢复酶活性，需要 3 种蛋白质。有趣的是，其中的一种是超氧化物歧化酶，催化除去有害的超氧化物负离子的反应的酶。在酪氨酸残基的酚环被氧化为自由基正离子的一个电子的氧化过程中， $\text{O}_2$  是电子受体。

B2 亚基是很不寻常的，它含有一稳定的有机自由基——具体地说，就是酪氨酸基自由基正离子。这一自由基是催化作用所必须的，加入羟基脲——自由基的猝灭

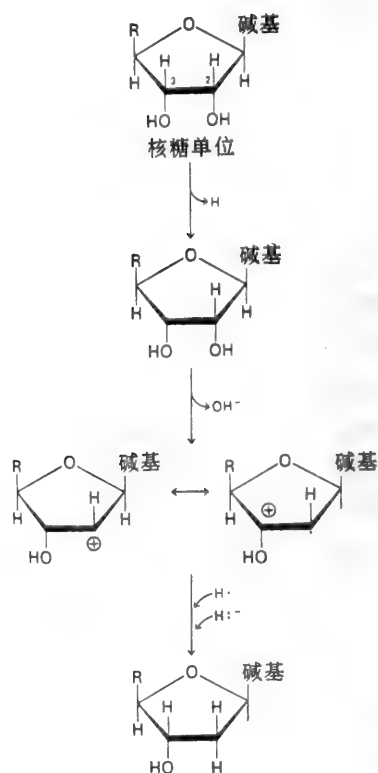


图 III-25-13 核糖核苷酸还原的可能机理。除去一氢原子，并形成自由基中间产物。[据 P. Reichard and A. Ehrenberg. *Science* 221 (1983): 514.]

在形成脱氧核糖核苷酸时，与核糖环的 C-2 成键的羟基被 H 所取代，这种取代有立体异构专一性。没有别的氢原子被插入或移去。在此反应中酪氨酸基自由基起着催化作用，而不是计量学的作用。其机理的实质是把自由基的性质暂时由酶传递到底物上去。酪氨酸基自由基从 C-3 汲取一个氢原子（图 III-25-13）。C-3 上自由基的存在促进 C-2 抛弃一个 OH<sup>-</sup>。这时糖环变成了自由基正离子。然后 B1 亚基上的硫醇将 C-2 还原，形成去氧核糖。由酪氨酸基自由基所汲取的氢原子同时也回到 C-3 上。

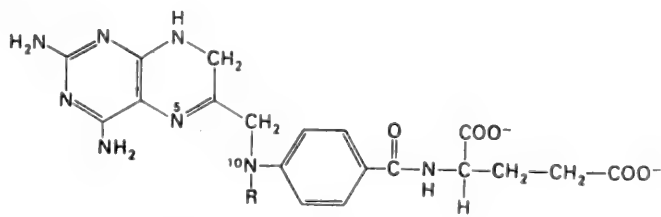
自由基参与这一反应使人回想起辅酶 B<sub>12</sub> 的作用，它也是起一种自由基源泉的作用。酪氨酸基自由基正离子和辅酶 B<sub>12</sub> 的碳-钴键是达到同一目的的两种方法，这个目的就是一个键的均匀裂解（homolytic cleavage）。事实上，有些细菌的核糖核苷酸还原酶（如 *Lactobacillus leichmanni* 的）就含有辅酶 B<sub>12</sub>，而不是铁中心和酪氨酸基自由基。为什么所有已知的核糖核酸还原酶都依靠自由基来完成催化作用呢？答案大概在于这种反应的非常苛刻的要求。在核糖核苷酸转变为去氧核糖核苷酸时，除去—H 交换—OH 外，不允许发生任何别的变化。

### 核糖核苷酸还原酶的底物专一性和催化活性是精确控制的

核糖核苷二磷酸的还原是受到变构相互作用的控制的。核糖核苷酸还原酶的 B1 亚基有两种类型的变构部位：其中之一控制酶的总活性，而另一个则调节底物的专一性。与 dATP 的结合是去氧核糖核苷酸丰富的信号，这信号降低核糖核苷酸的总催化活性。这一反馈抑制由于 ATP 的结合而被逆转。dATP 或 ATP 与底物专一性控制部位的结合则促进 UDP 和 CDP 这些嘧啶核苷酸的还原。与 dTTP 结合促进 GDP 的还原，也抑制嘧啶核苷酸的进一步还原。随后的 dGTP 水平的增高，则促进 ATP 的还原。很清楚，核糖核苷酸还原酶有许多构象状态，每一状态有不同的催化特性。这一复杂的调节型式为 DNA 合成所需的 4 种去氧核糖核苷酸提供了适当的供应。

### 几种抗癌药物阻断去氧胸苷酸的合成

（上略）然而，氨甲蝶呤是很毒的，因为它杀死繁殖迅速的细胞，不管它是恶性的还是良性的。骨髓的干细胞、肠道的上皮细胞和卵泡都极易受这种叶酸拮抗物的伤害，这就说明了它的许多有毒的副作用。



氨蝶呤 (R = H)  
和氨甲蝶呤 (R = CH<sub>3</sub>) 的结构

生长在氨甲蝶呤中的培养的哺乳动物的细胞会对其抑制作用产生抗性。这些突变株中有

一些不吸收氨甲蝶呤，因为转运系统有缺陷。另外一些之所以有抗性，是因为二氢叶酸还原酶活性部位中的变化使之对氨甲蝶呤的亲和力降低了。抗性的第三种机理是由于**基因扩增所引起的二氢叶酸还原酶的生产过量**。席姆克(R. Schimke)证明，当培养基中药物的水平提高时，可逐步筛选出产生此酶的量高达正常量 1000 倍的细胞。有些产生过量酶的细胞含有千百个二氢叶酸还原酶基因的拷贝。用培养细胞作的这些研究有力地说明：抗癌药物的剂量必须足够大，以防止突变株的存活，这些突变株是因基因的扩增而抗性越来越大的。

### 尿酸作为强有力的抗氧化剂起着有利作用

人血清中尿酸的平均含量接近于其溶解度的极限。与此相反，拟猴类（如胡猴）的尿酸含量却只有人的十分之一。在灵长类的进化过程中，尿酸水平明显地提高了。尿酸水平如此之高，以至于许多人极易患痛风症，这在自然选择上优点何在呢？原来尿酸有明显的有利作用。尿酸是非常有效的清除剂，能清除活性极高而且有害的含氧化合物，即羟基自由基、超氧化物负离子、单线态氧、加氧的血红素中间产物，其中 Fe 为高价（+4 和 +5）价状态。事实上，尿酸差不多是和抗坏血酸一样有效的抗氧化剂。人和拟猴类和其它低等的灵长类相比，尿酸水平较高，这可能与人的寿命较长和癌症的发病率较低有关。在尿酸方面也像在胆红素方面一样，我们看到这一原理的表达，即**降解代谢途径的某些最终产物作为保护性物质起着重要作用**。

## 第 26 章 代谢作用的整合

### 主要代谢途径和控制部位

(上略)。在肝脏中，磷酸果糖激酶的最重要的调节剂就是果糖-2,6-二磷酸 (F-2,6-BP)。回忆一下，F-2,6-BP 的水平决定于使之从果糖-6-磷酸形成的激酶的活性和水解其 2-磷酸基的磷酸酶的活性。当血糖水平低时，由胰高血糖素引发的级联反应导致肝脏中此磷酸酶的活化和此激酶的钝化。由此而造成的 F-2,6-BP 水平的降低导致磷酸果糖激酶的钝化，因而糖酵解变慢。

重要的是应注意到，肌肉中磷酸果糖激酶是受到不同方式的控制的。近年的研究证明，肌肉中催化 F-2,6-BP 合成的激酶是受 cAMP 所诱导的磷酸化作用的促进，而不是抑制。这样，肾上腺素就促进肌肉中的糖酵解，而抑制肝脏中的糖酵解，因为在其同功酶之间，有这种关键性的差异。由肾上腺素引起肝脏中糖原分解增加，其作用是向肌肉供应葡萄糖，而肌肉则迅速消耗葡萄糖，以产生 ATP 供收缩活动之需。(下略)。

### 糖尿病的代谢紊乱来源于胰岛素的相对不足和胰高血糖素的相对过量

现在我们来讨论糖尿病，一种复杂的疾病，其特点是燃料使用的整体情况不正常——肝脏产生过量的葡萄糖，而其它器官又使用不了那么多。尿中葡萄糖含量高。工业化的国家中糖尿病的发病率为 1%。事实上，糖尿病是最常见的严重的代谢疾病，它影响着上亿人。

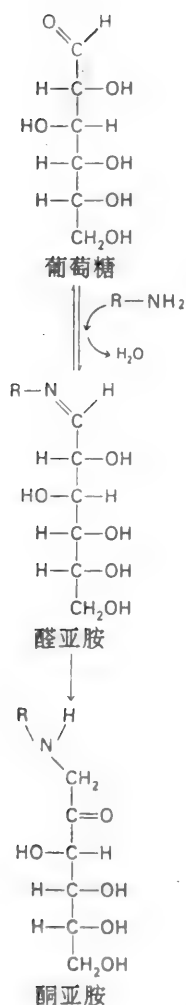
未经治疗的糖尿病人，其特点是葡萄糖代谢不正常——与病人的需要相比，胰岛素的水平太低，而胰高血糖素的水平太高。因为缺乏胰岛素，所以进入细胞的葡萄糖减少了。与胰岛素相比过量的胰高血糖素导致肝脏中 F-2,6-BP 含量的减少。因此，糖酵解被抑制而葡萄糖异生作用被促进。由此而产生的丙二酰 CoA 水平的下降活化了肉毒碱酰基转移酶 I。结果，脂肪酰 CoA 分子被有效地转运至线粒体衬质内以氧化成乙酰乙酸。高水平的胰高血糖素也引起脂肪组织中三酰基甘油的动员加强。糖尿病的一个显著特点就是燃料的利用从碳水化合物移向脂肪——比任何时候都丰富的葡萄糖被冷落了。

当血液中葡萄糖的水平超过了肾小管的再吸收能力时，葡萄糖就从尿中被排出。水和葡萄糖一同被排出，因此未经治疗的糖尿病人在严重时期又渴又饿。葡萄糖的损失使贮藏的碳水化合物耗尽，于是脂肪和蛋白质分解。脂肪的动员导致大量乙酰 CoA 的形成。可是大部分乙酰 CoA 不能进入柠檬酸循环，因为缩合步骤所需的草酰乙酸不够。回忆一下，哺乳动物能够用糖酵解的产物丙酮酸合成草酰乙酸，但不能用乙酰 CoA 合成，而是用以产生酮体。在正常代谢中大部分所产生的酸的形式是  $\text{CO}_2$ ，它迅速由肺排出体外。与此相反，酮体的酸不能通

葡萄糖与血红蛋白反应形成一种血糖水平的指示剂

所有人的红血细胞中都含有很小比例的血红蛋白 A<sub>1c</sub>。其形成速率与糖的水平成正比，因此糖尿病人比正常人的血红蛋白 A<sub>1c</sub> 的比例较高（6—15%，正常人 3—5%）。**血红蛋白 A<sub>1c</sub> 的水平反映的是数周之内总的血糖浓度。**因此，每隔数周测定一次血红蛋白 A<sub>1c</sub> 的水平在确定糖尿病人的血糖水平是否已得到了适当的控制方面是非常有用的。在发现血红蛋白 A<sub>1c</sub> 之前，需要更频繁地检查糖尿病人的血糖水平。

血红蛋白 A<sub>1c</sub> 作为一个模型, 说明蛋白质如何能被高水平的还原糖所破坏, 也是有意义的。许多糖尿病人在出现代谢病征之后多年, 会发展成破坏性的复杂情况, 例如血管中的粥样硬化病痕。一种工作假说是糖尿病的晚期复杂情况中, 有一些起源于葡萄糖与易受影响的蛋白质之间有了共价连结, 像血红蛋白 A<sub>1c</sub> 那样。正在进行详细的临床研究, 以了解糖尿病的长期的病征是否就是高血糖的后果, 还是别的因素所致。目前, 以血红蛋白 A<sub>1c</sub> 的测定为根据的高血糖的严密控制仍是糖尿病治疗中的最关紧要的目的。



816

## 第 27 章 DNA 的结构、复制和修复

遗传信息的贮存、传递和表达是本书这一部分(27—34章)的中心论题。DNA 在遗传中的作用和结构已在第 4 章介绍过,遗传信息流也在第 5 章介绍过。在有了关于蛋白质和代谢转变的丰富知识之后,我们再来讨论这一主题。

这一章中讨论 DNA 的结构、复制、突变和修复。我们将集中注意原核体系,因为它们已被详细研究过,而且也代表着一一般的原理。在后面一章中将讨论比较复杂的真核体系。DNA 的结构是动态的。沃森-克里克(Watson-Crick)双螺旋可以弯曲、纽结和散开。它也可采取不同的螺旋形式。DNA 寡聚体结晶的 X 射线分析已深刻阐明了这些构象特性。然后将讨论将 DNA 切断和连接起来的酶。与限制性核酸内切酶结合的 DNA 的结构揭示了这种专一性绝妙的酶是如何识别其靶子顺序的。下一个题目是 DNA 的拓扑学和超螺旋。拓扑异构酶类是一类令人迷惑的酶,它们催化 DNA 分子形成和打开超螺旋。

然后我们就作好准备可以研究所有生物学过程中最困难和最突出的问题之一,DNA 的复制。DNA 的合成如何开始?母链如何打开以作模板?极为准确的复制是如何完成的?DNA 聚合酶类的一个显著特性就是它固有的校对本领。本章的最后一部分讨论突变及其修复的分子本质。DNA 中的缺失不断地被多个过程所修复,这些过程利用完好链中的信息去指导损坏链的改正。

### DNA 的结构是动态的,并能采取各种各样的形式

沃森和克里克所推导出来的 DNA 的双螺旋结构深刻地影响了生物学的发展进程,因为它立刻提出遗传信息是如何贮存和如何复制的。如前所述,他们的模型的要点是:

1. 两条方向相反的多聚核苷酸链围绕着一个共同的轴形成右手双螺旋。
2. 嘌呤和嘧啶碱在螺旋里面,而磷酸根和脱氧核糖单位则在外面。
3. 腺嘌呤(A)与胸嘧啶(T)配对,鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。2 个方向准确的氢键加强了 AT 碱基对,3 个这样的键加强了 GC 碱基对。垛叠在同一链上的碱基之间的相互作用也使双螺旋稳定化。

沃森和克里克所提出的模型(称为 B-DNA)螺旋是以 DNA 纤维的 X 射线衍射图谱为根据的,此纤维所提供的信息是关于组成双螺旋的全部残基的平均特性的信息。从 DNA 的晶体可以得到更多的结构方面的信息。不过,这种研究必须等待合成大量 DNA 寡聚体技术的发展,这些寡聚体必须有确定的碱基顺序。在原子分辨率上进行的这种晶体的 X 射线分析表明,DNA 表现着比以往所想像的多得多的结构上的变异性和多样性。一条 DNA 的主链可以围绕着一个单体的 6 个键旋转,而不是像多肽链中那样只围着 2 个键旋转。即将讨论到,核糖环的皱缩和碱基的相对于糖的转向是重要的决定结构的因素。迪克尔逊(R. Dickerson)及其同事用结晶的 DNA 的十二聚体所作的 X 射线分析表明,其整个结构非常像沃森-克里克双螺旋。然而,此十二聚体与沃森-克里克模型的不同处在于它不是均匀的,与平均结构之间有相

当大的局部的偏差。沃森-克里克模型中每一完全的旋转中有 10 个残基，因此每一个残基与下一个残基相比，是旋转 36 度。在迪克尔逊的十二聚体中，此旋转角度在 28 至 42 度的范围内。与沃森-克里克模型之间的另一个偏差是一对中的 2 个碱基围绕其长轴发生方向相反的旋转（图 III-27-3）。这一结构特点称为**螺旋桨式扭转**（propellar twisting），它促进了每条链中碱基的垛叠。变异的另一个来源是**碱基成卷**（base roll），即相邻的碱基对彼此发生倾斜。关键性的发现是双螺旋的这些和别的局部的变化依赖于碱基顺序。寻找 DNA 中专一的靶子顺序的蛋白质，能通过此顺序对于双螺旋的精确形状的影响而感知其存在。

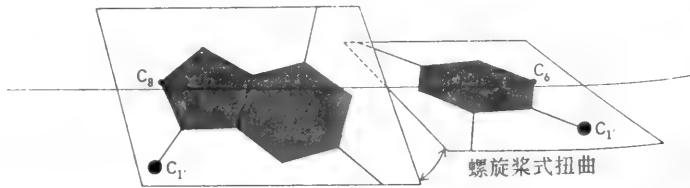


图 III-27-3 DNA 碱基对中的碱基并非绝对在同一平面上。它们互相扭转，好像螺旋桨上的螺旋叶。

B-DNA 螺旋的另一特点也值得注意。**螺旋可以顺利地弯成弓形或形成超螺旋，而在局部结构中很少变化。**这种易于变形的特点在生物学上是重要的，因为这样环状 DNA 就能够形成，而且 DNA 可以卷在蛋白质周围。DNA 能否被密装进一个小得多的体积内，决定于其变形的能力。假设 DNA 非呈线状不可，它就不能被装在细胞内。DNA 还能**纽结起来**（kinked）——即在很小的部位上弯曲。特定的碱基顺序可以引起纽结，例如连续有至少 4 个腺嘌呤或与蛋白质结合。

主槽和次槽均衬有对顺序专一的、  
由氢键连结起来的基团

B-DNA 螺旋的一个值得注意的特点就是有两种沟槽，称为主槽（major groove，宽 12

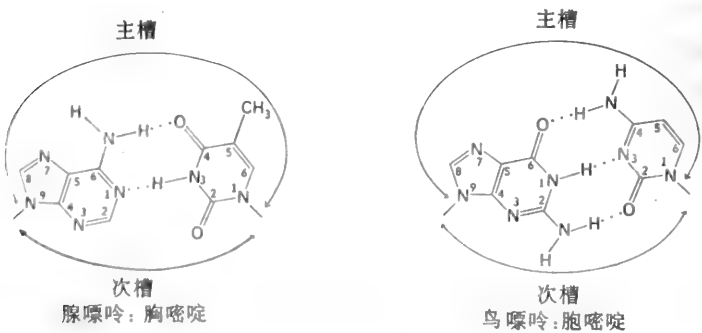


图 III-27-5 DNA 的 AT 和 GC 碱基对含有形成更多氢键的原子。主槽和次槽均以不同的潜在的供体和受体为内衬。



Å) 和次槽 (minor groove, 宽 6 Å)。它们之所以出现, 是因为碱基对的糖苷键并非彼此在对角线的两端。次槽包括碱基对的嘧啶 O-2 和吡啶 N-3, 主槽则在碱基对的另一侧 (图 III-27-5)。主槽比次槽略深 (8.5 和 7.5 Å)。每一个槽均以潜在的氢键的供体和受体原子为内衬。在次槽中, 腺嘌呤与鸟嘌呤的 N-3 和胸嘧啶与胞嘧啶的 O-2 可作为氢受体, 而连在鸟嘌呤的 C-2 上的氨基可作为氢供体。让我们以 *n* 代表 N-3, *o* 代表 O-2, 而以 *h* 代表氨基中的氢。因此, 在次槽中, 供体和受体的形式是: *no* (AT), *on* (TA), *nho* (GC) 和 *ohn* (CG)。在主槽中, 鸟嘌呤和腺嘌呤的 N-7 是潜在的受体, 胸嘧啶的 O-4 和鸟嘌呤的 O-6 也是。连在腺嘌呤的 C-6 和胞嘧啶的 C-4 上的氨基可作为氢供体。这样, 主槽的型式是: *nho* (AT), *ohn* (TA), *noh* (GC) 和 *hon* (CG)。注意, 主槽的特点比次槽的特点更显著。还有, 主槽较大也使它更易与识别专一的 DNA 顺序的蛋白质发生相互作用。

### RNA 的 2'-OH 适合于碱基对倾斜的 A-DNA 螺旋, 但不适合于 B-DNA 螺旋

脱水的 DNA 纤维的 X 射线衍射研究揭示出一种称为 A-DNA 的形式, 当相对湿度降低至约 75% 以下时这种形式出现。A-DNA 和 B-DNA 一样, 是右手双螺旋, 由两条反向平行的链组成, 两条链由沃森-克里克的碱基配对结合在一起。A-DNA 比 B-DNA 较粗和较短,

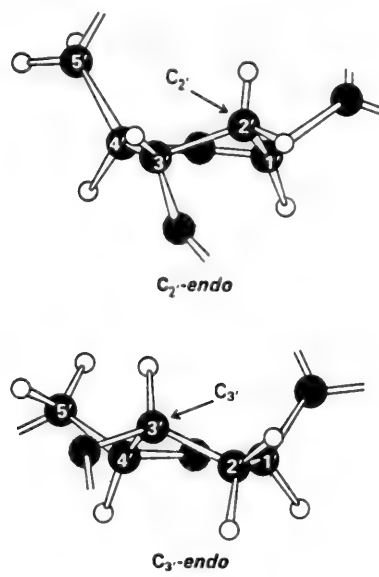


图 III-27-7 糖的皱缩显著影响磷酸二酯桥和糖苷键的取向。*C<sub>2</sub>'-endo* (存在于 B-DNA 中) 和 *C<sub>3</sub>'-endo* (存在于 A-DNA 中) 表示核糖环中的那个原子在图中所示的取向平面之上。

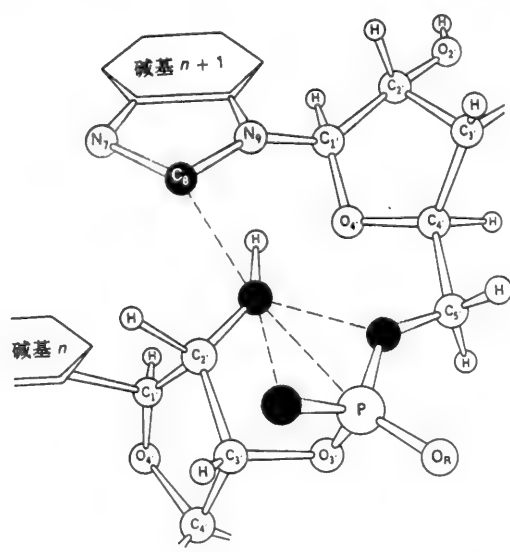


图 III-27-8 核糖不能合于 B-DNA 类型的螺旋, 因为没有足够的空间放下 2'-氧原子。4 个接触点将小于范德华引力所允许的距离。[根据 R. E. Dickerson, *The DNA helix and how it is read*, 1983. Scientific American, Inc.]

其碱基是倾斜的，而不是与螺旋的轴相垂直。这两种螺旋的许多结构上的差异来源于核糖单位的皱缩情况不同。如前所述，呋喃糖环可能这样皱缩：4个原子几乎在同一平面上，而第五个则距此平面约0.5 Å。当C-2'不在平面上时所形成的结构称为C<sub>2'</sub>-桥（C<sub>2'</sub>-endo），当C-3'不在平面上时所形成的结构称为C<sub>3'</sub>-桥（图Ⅲ-27-7）。A-DNA有C<sub>3'</sub>-桥的糖单位，而B-DNA则有C<sub>2'</sub>-桥的糖。糖单位中这种不大的差别却具有放大的效果。C<sub>3'</sub>-桥的皱缩使得碱基对偏离了螺旋轴的法线19度。而且，次槽几乎消失了。A螺旋中的磷酸根所结合的H<sub>2</sub>O分子比B-DNA中磷酸根的为多。因此，脱水有利于A型。

A类型的螺旋并不限于脱水的DNA。RNA的双螺旋区（如发夹中的）和杂交的RNA-DNA所呈的双螺旋形式与A-DNA的极为相似。核糖的2'-OH防止RNA形成沃森-克里克类型的螺旋，由于有空间位阻。O-2'也不适于B-螺旋，因为它使相连的磷酸基团的3个原子和下一个碱基中的1个原子靠得太近。在A-DNA中则相反，O-2'向外伸出，离开了其它原子。

Z-DNA 是左手双螺旋，其主链上的磷酸根呈锯齿形排列

第三种类型的DNA螺旋是里奇（A. Rich）及其同事在解决CGCGCG的结构时发现的。

表Ⅲ-27-1 A-、B-和Z-DNA 的比较

	螺旋类型		
	A-	B-	Z-
形状	最宽	居中	最长
每对碱基升高	2.3 Å	3.4 Å	3.8 Å
螺旋直径	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
扭曲方向	右手	右手	左手
糖苷键	反	反	C,T反,G顺
螺旋每转一圈的碱基对数	11	10.4	12
螺旋每转一圈的螺距	24.6 Å	33.2 Å	45.6 Å
碱基距螺旋轴法线的倾斜度	19°	1°	9°
主槽	窄而极深	宽而相当深	平
次槽	极宽而浅	窄而相当深	极窄极深

他们发现这种六核苷酸形成反向平行链的双链，如所预期，此双链由沃森-克里克碱基配对连结在一起。不过令人惊奇的是，这一双螺旋是左手的，与A和B螺旋相反。另一显著区别是在主链中的各磷酸根呈锯齿状排列，因此称这种新的形式为Z-DNA（Z为zigzag的第一字母）（图Ⅲ-27-9）。呈锯齿形的原因是重复的单位是二核苷酸而不是单核苷酸。第三个区别就是Z-DNA只有一个深的螺旋的槽。

为什么会出现这种不同的结构?Z-DNA之所以能够形成,是由交互出现的嘧啶和嘌呤所造成的。这种规律使得糖苷键的**反型**和**顺型**交替出现。当碱基和糖成**反型**时,它们离得远,而当它们成**顺型**时,则彼此相邻。嘧啶核苷酸本身通常具有**反型**糖苷键,而嘌呤核苷酸则既可为**顺型**,也可为**反型**。在A-和B-DNA中所有的糖苷键都是**反型**。可是在Z-DNA中,则嘧啶碱的为**反型**,而嘌呤碱的为**顺型**。

在B-DNA中可能存在一段Z-DNA,将碱基对倾斜180度,并将嘌呤残基的糖旋转即可将相互交替的嘧啶-嘌呤顺序由B-DNA转变为Z-DNA(图Ⅲ-27-11)。可是,Z-DNA的形成通常在热力学上是不利的。Z-DNA中磷酸根之间的静电斥力大于B-DNA中的,因为在前者之中相对的链中最近的基团间的距离是8Å而不是12Å。然而当胞嘧啶的C-5上发生甲基化时,转变为Z-形式就变得是有利的了,这种修饰发生在真核生物中。Z-DNA中这一部位上的甲基填充了一个小洞,并促进疏水的相互作用;在B-DNA中,这一甲基被水所包围,这是一种不利的情况。天然存在的DNA分子的反的超螺旋的形成也促进B-DNA转化为Z-DNA。事实上,对Z-DNA专一的抗体能使真核的染色体上有不连续的区域被染上。真核的DNA也含有许多重复的嘧啶-嘌呤顺序(例如,CAC ACA),这是能形成Z-DNA的顺序。

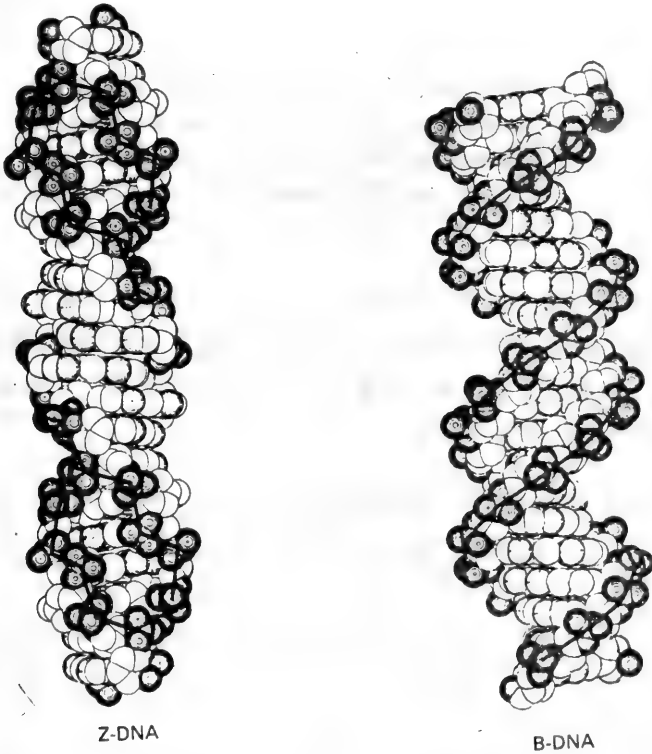


图 Ⅲ-27-9 左手螺旋Z-DNA与右手螺旋B-DNA的比较。另一区别是糖-磷酸主链在Z-DNA中呈锯齿形,因为重复的单位是二核苷酸。在B-DNA中相反,主链顺利卷曲,因为重复的单位是单核苷酸。

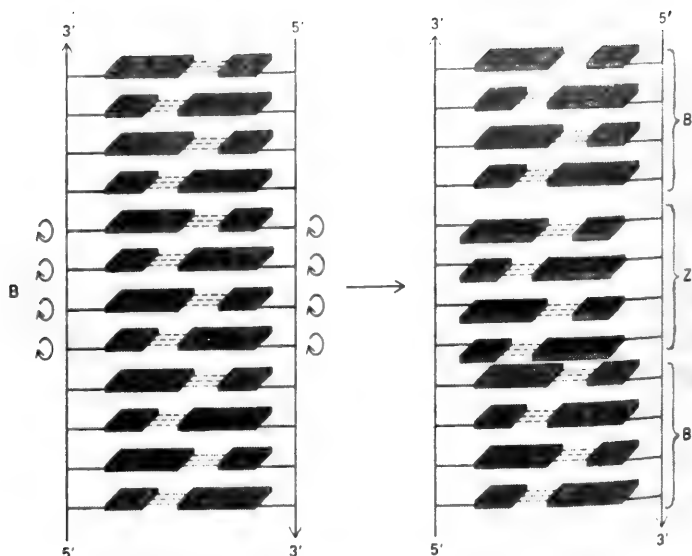


图 II-27-11 将碱基对倾斜,即可将一段 B-DNA 转变为 Z-DNA。碱基的两面分别为浅色和深色。形成 Z-DNA 需要交替出现的嘧啶-嘌呤顺序。[根据 A. Rich, A. Nordheim and A. H. J. Wang, *The Chemistry and Biology of left-handed Z-DNA*. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 791, 1984.]

细菌和真核的基因组中的大部分 DNA 都存在于经典的沃森-克里克 B-DNA 形式。不过,既与 A-DNA 不同又与 B-DNA 不同的 Z-DNA 的发现,着重说明了 DNA 是可变的、动态的分子。知道 Z-DNA 是否在生物学上有重要意义将是非常有趣的。假若自然并没有开发利用它的不寻常的特点,那将是令人惊奇的。

### 脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶 I) 通过静电引力与 DNA 双螺旋的次槽相结合

我们现在来研究蛋白质-DNA 的相互作用,其代表是核酸酶对 DNA 的识别。牛胰脏的脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶 I) 是一种消化酶,专一性不强,它把 DNA 降解为具有 5'-磷酸和 3'-羟基末端的短的寡核苷酸。这种 30kd 的核酸内切酶的晶体结构已在高分辨率下阐明了。果如所料,在 DNA 底物与酶结合方面静电的相互作用起了突出的作用。一个含有精氨酸和赖氨酸残基的五肽环紧密地装入了 DNA 的次槽中。这些残基以及另外的 5 个精氨酸和赖氨酸侧链与 2 条链的磷酸根形成盐桥,这些磷酸是在次槽的内面的。酶与 DNA 的大约相当于一转 (34 Å) 的一长段区域相互作用。酶的许多带正电荷的基团与双链底物的带负电荷的基团相配对,这就是为什么双螺旋的 DNA 被水解的速度是单链 DNA 水解的  $10^4$  倍的原因。另一方面,此酶不与 DNA 的碱基密切地相互作用,所以不能有效地区分核苷酸顺序。

核苷酸酶复合物的 X 射线分析提出了一个可能的催化机理。活性需要一两价的正离子，正如所有其它催化磷酸基转移的酶一样。在晶体中， $\text{Ca}^{2+}$  被结合，靠近易裂的磷酸二酯键；在细胞中， $\text{Mg}^{2+}$  可以起同样的作用。其它关键的基团是结合着的水分子、组氨酸残基和谷氨酸残基（图 III-27-13）。水分子被活化，因为它的一个质子转移到组氨酸了。所形成的带正电荷的咪唑环侧链又由于与带负电荷的谷氨酸侧链之间的静电引力而稳定化了。这种谷氨酸-组氨酸-水的三元组（triad）使人想起糜蛋白酶和其它丝氨酸蛋白酶类的天冬氨酸-组氨酸-丝氨酸三元组。这样所形成的氢氧离子攻击易裂键中的磷原子形成一五共价的中间产物。 $\text{Ca}^{2+}$ （或  $\text{Mg}^{2+}$ ）由于与带负电荷的氧原子发生静电的相互吸引，而使此中间产物稳定化。最后，在三角形双锥形体另一个相对角上的  $3'\text{-O}$  基团离开，在已被切断的 DNA 链上留下了  $5'$ -磷酸末端。

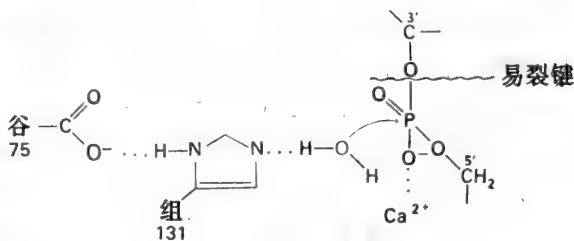
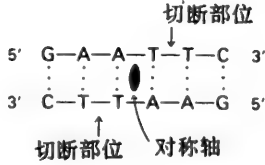


图 III-27-13 DNA 酶 I 中起催化作用的三元组。

易裂键的磷原子被氢氧离子所攻击，氢氧离子是因质子转移给组氨酸而由水形成的。所产生的带正电荷的咪唑环则被带负电荷的谷氨酸的侧链所稳定化。

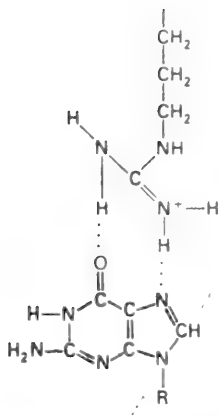
### EcoR I 核酸内切酶将其旋转对称的靶子解链，并形成多个氢键

限制性内切酶与 DNA 酶 I 相反，是在高度专一的部位切开 DNA 的两条链。这种精妙绝伦地准确的手术刀使得生物学中 DNA 的革命成为可能（第 6 章）。正如将在第 34 章中讨论的，细菌利用限制性内切酶作为防护手段去降解外源 DNA。它们自己的 DNA 不被切断，因为潜在的靶子部位被甲基化了。限制性内切酶为什么会有极高的专一性？EcoRI 这种限制性内切酶识别一种六核苷酸的靶子顺序。这种回文结构的（palindromic）核苷酸顺序，像所有已知的限制性内切酶的靶子顺序一样，具有双重的旋转对称（rotational symmetry）。两条链都是在完全相同的部位被切断的，而这两个部位是放在相对于双重轴上的对称的位置上的。



这种酶识别双重对称的部位，并且对称地切断两条链——因此，这种酶也应该是对称的。事实上，它是对称的。EcoRI 内切核酸酶是完全相同的亚基（各为 31kd）的二聚体，并与 DNA 结合，因而 DNA 靶子部位的双重轴与酶的双重轴吻合。这样，酶的对称性与其底物的对称性是相互配合的。

酶如何从 DNA 中的所有六核苷酸中选择 GAATTC 呢？高度的选择性要求酶与碱基之间



图Ⅲ-27-16 在内核核酸酶的精氨酸残基与靶子部位中的鸟嘌呤之间的氢键。主链中G与A之间的切割活跃部位并未在晶体中完全形成，因为未加 $Mg^{2+}$ 以获得稳定的酶-底物复合物。

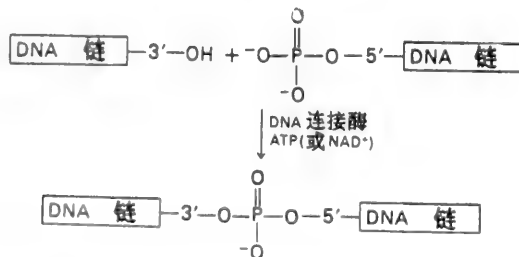
有密切的接触。这是由双螺旋在六核苷酸靶子的中央发生纽结(kinking)而完成的。双螺旋的这种突然的瓦解称为**类型I的新纽结**(type I neokink)；“新”表示这种纽结是由外因(例如药物或酶)所引起的。**新纽结使DNA螺旋打开25度，使主槽加宽将近4Å。**这种扩张使得 $\alpha$ -螺旋能进入主槽，以辨认所应辨认的碱基。

一个 $\alpha$ 螺旋带有一精氨酸侧链，它与靶子部位的鸟嘌呤形成2个氢键(图Ⅲ-27-16)。同一亚基的第二个 $\alpha$ -螺旋含有一个精氨酸和一个谷氨酸残基，它们与靶子顺序中相邻的腺嘌呤共形成4个氢键。此酶的另一亚基与DNA的另一条链中对称的GAA有同样的接触。这样，这种蛋白质-DNA相互作用的高度专一性的基础是对称性和12个方向准确的氢键的形成。

所有4个 $\alpha$ -螺旋均有一定取向，因而其氨基末端均与DNA接触。这种排列是非常重要的，因为 $\alpha$ -螺旋是偶极性的；其氨基末端带有约半个正电荷，而羧基末端则带有约半个负电荷。因此，**这一束4个平行的 $\alpha$ -螺旋就通过静电引力而被DNA主链的磷酸基团所吸引。**我们可以这样描绘EcoRI核酸内切酶，它沿着主槽滑行，瞬时使DNA纽结，并寻找在双重轴上相互成对的GAA，这双重轴和酶中的双重轴一样。值得注意的是，尽管靶子部位的碱基互相间是完全配对的，和在经典的沃森-克里克双链中的一样，仍可完成准确的识别。这意味着酶不必将碱基对拉开就能够评估一个六核苷酸顺序，拉开碱基无疑会减慢筛选外源DNA的过程。EcoRI核酸内切酶的作用方式表明，假若首先使DNA的主槽变宽，就可以极高的准确性阅读碱基对。其他高度专一的与DNA结合的蛋白质对DNA的识别将在第32章中讨论。

## DNA连接酶将双链区域中DNA的末端连接起来

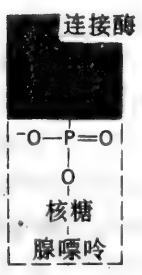
环状DNA的发现指出必定存在一种把DNA链的两端连接起来的酶。1967年，几个实验室的科学家同时发现了**DNA连结酶**。这种酶催化一条DNA链末端的3'-OH与另一条链末



图Ⅲ-27-18 DNA连接酶催化两条DNA链的连接，这两条链是一双螺旋分子的一部分。

端的5'-磷酸基之间磷酸二酯键的形成。需要能源来推动此吸能反应。在大肠杆菌和其他细菌

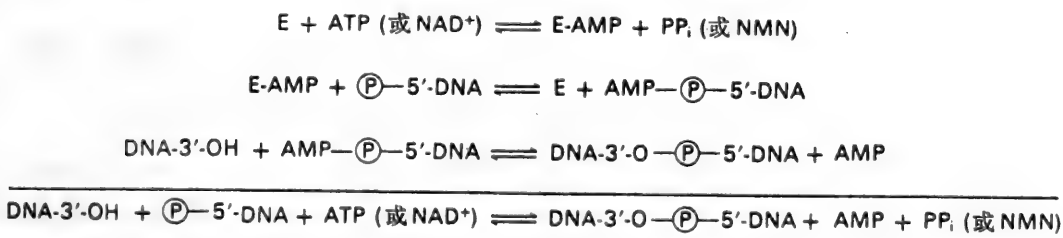
中，NAD<sup>+</sup> 起这种作用；在动物细胞和噬菌体中，ATP 是能源。以后将要讨论到，对于 DNA 的正常合成，破坏的 DNA 的修复和在遗传操作中 DNA 链的剪接，这种连接过程都是必需的。



图Ⅲ-27-19 NAD<sup>+</sup> 与酶的赖氨酸残基反应所形成的共价的连接酶-AMP 中间产物。在此中间产物中 AMP 部分被活化了。

DNA 连接酶不能连接单链 DNA 的两个分子。而是由 DNA 连接酶连接的 DNA 链必需是属于一个或数个双螺旋分子的。大肠杆菌的这种酶通常只有当靠近这一连接处至少有数个碱基对时，才能形成磷酸二酯桥。T4 噬菌体所编码的连接酶能连接 2 个具有平整末端的双螺旋片段，在重组 DNA 技术中就利用这种能力。

让我们来看看连接的机理，这是由莱曼 (I. R. Lehman) 阐明的。ATP (或 NAD<sup>+</sup>) 与 DNA 连接酶反应形成一共价的酶-AMP 复合物 (酶-腺苷酸复合物)，其中 AMP 通过磷酸酰胺键与酶的赖氨酸残基的 ε-氨基发生连接 (图Ⅲ-27-19)，同时释放出焦磷酸 (或烟碱酸酰胺单核苷酸 NMN)，然后活化的 AMP 部分就由赖氨酸残基上转移到 DNA 链的 5'-末端的磷酸基上去，形成 DNA-腺苷酸复合物。最后一步是 3'-OH 基团对此活化的 5'-磷原子的攻击。这一反应序列 (图Ⅲ-27-20) 是由焦磷酸的水解推动的，而焦磷酸则是形成酶-腺苷酸复合物时释放出来的。这样，假若 ATP 是能源而 PP<sub>i</sub> 又被水解，则两个 ~P 就消耗于 DNA 主链中磷酸二酯桥的建造。



图Ⅲ-27-20 DNA 连接酶所催化的反应的机理。

### DNA 的连接数是拓扑学的特性，它决定着超螺旋的程度

1963 年，维诺格拉德 (J. Vinograd) 发现将多瘤病毒的环状 DNA 离心时，出现了两条带。在解开这个谜的过程中，他发现了环状 DNA 的一种特性，这是线状 DNA 所没有的。考虑 B-DNA 形式中的一个 260bp 的 DNA 双螺旋 (图Ⅲ-27-21A)，在此线状 DNA 中螺旋转数为 25 (260/10.4)。现在让我们把这一螺旋的两端连接起来。这一环状 DNA 就称为松弛的 (图Ⅲ-27-21B)。若在连结两端之前，将线状双螺旋中的 2 个转解开，即可形成另一种环状 DNA (图Ⅲ-27-21C)。这样折起来的环状 DNA 结构含有 B-螺旋的 23 个转和 1 个打开的环 (图Ⅲ-27-21D)。另一种可能是，它形成一个有 25 个转和 2 个超螺旋转的结构 (图Ⅲ-27-21E)。事实上，这种超螺旋的形式比那种有一个解开的环的形式在热力学上更为有利。

超螺旋明显地改变了 DNA 的整个形式。超螺旋的 DNA 分子比长度相同的松弛的 DNA 分子更为紧凑。因此，在离心或电泳时超螺旋的 DNA 比松弛的 DNA 移动得快。维诺格拉得的实验中沉降快的 DNA 是超螺旋的，而沉降慢的 DNA 则是松弛的，因为其中的一条链上有切口。

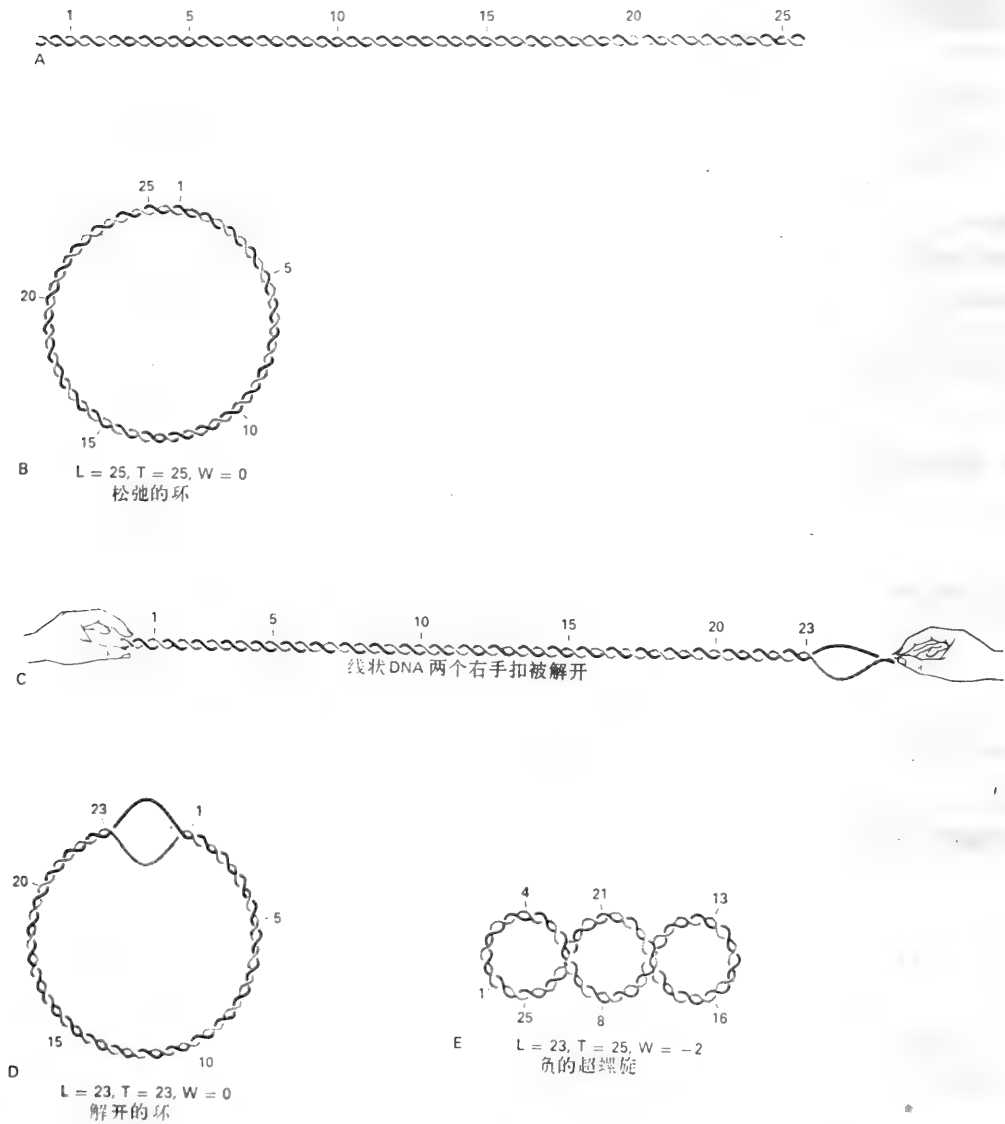


图 Ⅲ-27-21 环状 DNA 分子的连锁数 ( $L$ )、扭曲数 ( $T$ ) 和超螺旋的转数 ( $W$ ) 的定义。[据 W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, 1984, p. 452.]

来自拓扑学的概念丰富了我们对于 DNA 构象的了解。拓扑学是数学的一个分支，它研究



那些不因变形(如拉长和弯曲)而改变的结构特性。环状 DNA 分子的关键性拓扑学特性就是它的**连锁数** ( $L$ , linking number), 其定义是一条 DNA 链沿右手方向缠绕另一条链的次数。图 III-27-21B 中松弛的环状 DNA 的  $L = 25$ , 有两转被打开的同一条环状 DNA 的  $L = 23$  (D); 还是这条链, 在闭合之前线状双螺旋中有两个整转被打开而形成的超螺旋 (E), 其  $L = 23$ 。仅仅是连锁数不同的分子互为**拓扑异构体** (topoisomer)。只有切断一条或两条 DNA 链, DNA 的拓扑异构体才能相互转变。

上述有两转被打开的环状 DNA 和另一条超螺旋的 DNA  $L$  值相同, 但其沃森-克里克螺旋中的转数 ( $T$ , 扭曲数, twisting number) 和超螺旋的转数 ( $W$ , writhing number) 均不同。  $T$  和  $W$  之间有什么关系? 有的。拓扑学告诉我们,  $T$  和  $W$  之和就是  $L$ 。

$$L = T + W$$

$T$  和  $W$  可以不是整数, 但  $L$  必为整数。有两转打开的环状 DNA,  $T = 23$ ,  $W = 0$ ; 而超螺旋的 DNA, 则  $T = 25$ ,  $W = -2$ 。这两种形式可以不必切断 DNA 链而互相转变, 因为其  $L$  值相同, 均为 23。  $L$  在沃森-克里克螺旋的转数与超螺旋的转数之间的分配决定于热力学。超螺旋 DNA 优于打开几转的 DNA, 因为前者含有更多个配对的碱基。一般而论,  $T$  之值差不多等于碱基对的数目除以 10.4。因此, DNA 的连锁数的变化通常导致超螺旋程度(超螺旋数)的变化, 而不是沃森-克里克转数(扭曲数)的变化。  $L$  (因此  $W$ ) 仅差 1 单位的拓扑异构体很易于为琼脂糖凝胶电泳所分开。

## 大多数天然存在的 DNA 分子都是负的超螺旋

DNA 的超螺旋程度可用**比连锁差** ( $\lambda$ , specific linking difference) 来表示,  $\lambda$  与分子长度无关。

$$\lambda = (L - L_0)/L_0$$

$L_0$  为松弛的 DNA 分子的连锁数。若一超螺旋 DNA 的  $L = 23$ ,  $L_0 = 25$ , 于是  $\lambda = -0.08$ 。这一数值也称为**超螺旋密度** (superhelix density), 因为  $L - L_0$  通常大致等于  $W$ 。大多数天然存在的 DNA 的超螺旋密度在  $-0.03$  和  $-0.09$  之间。负号表示自然界的超螺旋是左手的。换言之, 它们起源于双螺旋的**张开** (unwinding) 或**转数不够** (under winding)。重要的后果是, 形成负的超螺旋的 DNA 分子是作好了准备被解开的。负的超螺旋使得 DNA 为那些要求将两股链分开的过程作好了准备, 这些过程是: 复制、重组和转录。正的超螺旋在使 DNA 紧凑方面和负的超螺旋一样有效, 但会使链的分开困难得多。我们在这里看到了不得不选择负的超螺旋的理由。

## 拓扑异构酶 I 催化超螺旋 DNA 的松弛

DNA 的拓扑异构体的相互转变是由**拓扑异构酶类**所催化的, 这是由王 (J. Wang) 和盖勒尔特 (M. Gellert) 所发现的酶。这些酶由于催化一三步的过程而改变 DNA 的连锁数。(1) 切**开** DNA 的一条或两条链, (2) 使一段 DNA **通过**这一切口, (3) 将 DNA 切口**再封好**。类型 I 的拓扑异构酶仅切断 DNA 的一条链, 而类型 II 的酶则切断两条链。

大肠杆菌的类型 I 拓扑异构酶催化 DNA 的负超螺旋的松弛。一种合乎逻辑的可能性是

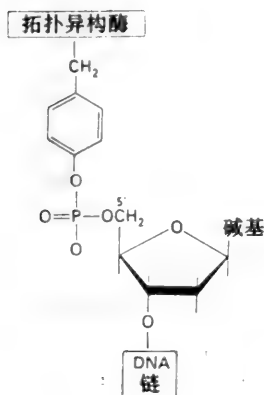


图 27-26 在拓扑异构酶作用中的共价酶底物中间产物。切断的 DNA 链的 5'-磷酸末端与酶的专一的酪氨酸残基形成共价键。

## DNA 促旋酶催化由 ATP 推动的向 DNA 中引入负超螺旋的作用

拓扑异构酶 I 所催化的反应，即 DNA 超螺旋的松弛，在热力学上是放能的。把超螺旋引入又怎么样？形成超螺旋消耗能量，因为超螺旋分子与松弛的相比，是处于扭力之下的。向  $\lambda = -0.06$  的 DNA 分子中再引入一个超螺旋要消耗约 9 千卡/摩尔。因此，在天然存在的 DNA 分子的超螺旋中贮藏了许多能量。

大肠杆菌中超螺旋的形成是由 DNA 促旋酶所催化的，这是由两条 105kd 的 A 链和两条 95kd 的 B 链所组成的拓扑异构酶。DNA 促旋酶是一种转化能量的装置：它把 ATP 的自由能转化为超螺旋中的扭力能。反应开始时约 200bp 的 DNA 围绕着菱形的酶卷起。然后 ATP 的结合引发了 DNA 两条链的切开，一条链的切开部位与另一条链的切开部位错开 4 个核苷酸。每一切开链的 5'-磷酸末端连在此酶的 A 亚基的专一的酪氨酸残基上。切开的 DNA 两端固定不动，这是防止其自由旋转所必需的，自由旋转会迅速导致超螺旋的丧失。

下一步是一段 DNA 通过固定的两端之间约 35Å 的缺口。这种通过是有方向的——DNA 促旋酶只允许那种导致负超螺旋方向的运动发生。切断的 DNA 的末端然后合到一起，重建双螺旋的两条链的连续性。最后，结合的 ATP 水解，引起转运过来的 DNA 片段的释放，于是酶又可开始另一轮催化作用。DNA 促旋酶每作用两步，其底物的连锁数就减少 1，因为双链 DNA 要通过两条链中的缺口。每秒钟大约引入两个负超螺旋。DNA 促旋酶可以重复作用于同一 DNA 底物，而不必从底物上解离下来。

这样，细菌 DNA 的超螺旋程度决定于两种酶的相反的作用。DNA 促旋酶引入负的超螺

旋，而拓扑异构酶 I 则除去超螺旋。这些酶的量是受到调节的，故可保持适当程度的负超螺旋。DNA 促旋酶是几种抗菌素的靶子。**萘啶酮酸**是用于治疗尿道感染的，它干扰 DNA 链的切断和连接。**新生霉素**阻断 ATP 与促旋酶的结合。

### DNA 聚合酶 I 含有一深裂缝用于与双螺旋 DNA 结合

这种三功能的酶可被蛋白酶分解为大、小两种片段。小片段 36kd，带有全部原来的 5'→3' 核酸外切酶活性；大片段 67kd [亦称为克连诺 (Klenow) 片段]，带有全部聚合酶和 3'→5' 核酸外切酶活性。大片段的 X 射线结晶学研究表明，它是由两种清楚的结构域组成的。小结构域大概含有 3'→5' 核酸外切酶部位，因为它与脱氧核糖核苷单磷酸结合，此核苷酸抑制核酸酶但不抑制聚合酶活性。dTMP 的磷酸基还与  $Zn^{2+}$  结合。大结构域形成一有深裂缝的结构，此裂缝类似一只拿着棍棒的右手。裂缝宽约 25 Å，深 30 Å，长 50 Å。裂缝的大小和形状说明它与 DNA 合成中的双链产物相结合。DNA 聚合酶 I 的作用可能是由于此裂缝的关闭，关闭会使聚合过程中酶从 DNA 上的解离变慢。小结构域上的核酸外切酶部位距大结构域上聚合酶部位约为 25 Å。一种有趣的可能性是生长中的 DNA 链在感觉到不配合的碱基对之前，一直停留在聚合酶部位上，这种碱基对将引发 DNA 链被转运至 3'→5' 核酸外切酶部位上，以备切去。

### 复制从 *ori C* (起点) 部位的解链开始

DNA 的合成如何开始？带有 *ori C* 的质体在阐明这一关键过程的分子机理方面曾是极有价值的，*ori C* 是大肠杆菌中复制的唯一起点。*ori C* 座位是大肠杆菌染色体中一 245 碱基对的顺序，这染色体是含有  $4 \times 10^6$  个碱基对的 DNA 分子。起点有一些不寻常的特点 (图 II-27-40)。它含有 3 个顺序几乎完全相同的 13 聚核苷酸的并列簇。每一顺序由 GATC 开始，此顺序在 *oir C* 中出现 11 次，比在随机的基础上所预测的要多许多次。GATC 中腺嘌呤的甲基化可能在控制复制何时开始方面是重要的。DNA 的适时复制是关键性的，因为它必须对细胞重量的信号发生反应，并与细胞分裂相协调。

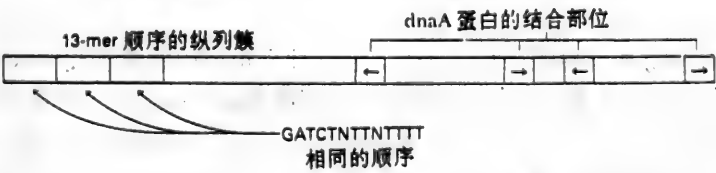


图 II-27-40 大肠杆菌中复制的起点 *ori C* 长 245 个 bp。它含有 3 个几乎完全相同的 13 个核苷酸顺序的并列簇和 *dnaA* 蛋白的 4 个结合部位。箭头表示 4 个 *dnaA* 部位的方向。

**dnaA 蛋白** (根据其基因命名) 结合到 *ori C* 的 4 个部位上，于是一复杂系列的步骤开始了，这些步骤导致模板 DNA 的解链和引子的合成。DNA 必须是负的超螺旋，以便与 *dnaA* 结合。*dnaB* 和 *dnaC* 蛋白的复合物与 *dnaA* 合在一起使双螺旋弯曲和打开。**dnaB 是解螺旋酶**：它催化由 ATP 推动的双螺旋 DNA 的解链。然后，被解螺旋的那部分 DNA 被单链结合蛋白 (SSB，

single-strand binding protein) 所稳定化。此蛋白是由 19kd 亚基组成的四聚体, 它们协同一起与单链 DNA 结合。假若连锁数保持不变, 那么 DNA 在起点处的解螺旋将会引起环状 DNA 形成正的超螺旋, 而解螺旋也将迅即停止。DNA 促旋酶的补偿作用防止了这一现象的发生, 当此酶水解 ATP 时即引入负的超螺旋。

DNA 聚合酶 III 全酶是加工能力强而又准确的酶,  
它合成大多数 DNA

表 III-27-2 DNA 聚合酶 III 全酶的组成

亚基	分子量 (kd)
$\alpha$	140
$\epsilon$	27
$\theta$	10
$\beta$	37
$\tau$	78
$\gamma$	52
$\delta$	32
$\delta'$	32

现在舞台已为 DNA 聚合酶 III 全酶的出场作好了准备。这种多种亚基的组装体 (表 III-27-2) 的特点是加工能力极强、催化能力强、准确性高。与 DNA 聚合酶 I 只催化 20 个键的形成不同, 这种全酶催化数千个磷酸二酯键的形成后才离开其模板。DNA 聚合酶的加工能力低, 这非常适合于它的功能, 即填补空缺和起修复作用。另一方面, DNA 聚合酶 III 全酶的设计则是要抓住模板, 而且在完成复制之前不能让模板跑掉。全酶的另一个显著特点是它的催化妙技, 每秒钟添加 1000 个核苷酸, 而 DNA 聚合酶 I 每秒钟只添加 10 个。这种加速的催化并不伴随着准确性的丧失。聚合酶 III 的高超的催化妙技主要是由于其加工能力强; 在反复地上下模板过程中不浪费时间。

DNA 聚合酶 III 的这些突出的特点来之不易。此全酶至少由 8 种多肽链组成, 其质量为 800kd, 几乎比单链 DNA 聚合酶 I 的质量大了一个数量级。这种全酶的某些亚基的作用已被阐明。催化活性位于  $\alpha$  亚基,  $3' \rightarrow 5'$  核酸外切酶活性位于  $\epsilon$  亚基。 $\alpha$ 、 $\epsilon$  和  $\theta$  亚基形成一核心, 它有催化活性但加工能力不强。 $\beta$  亚基对高度的加工能力有贡献, 大概是把酶的核心夹在其模板上。DNA 复制的许多步骤确实需要消耗  $\sim P$ , 以便依次地结合和释放反应物, 并把复制器具沿着模板的链推进。

前导链和后随链是由二聚的 DNA 聚合酶 III 在复制叉上合成的

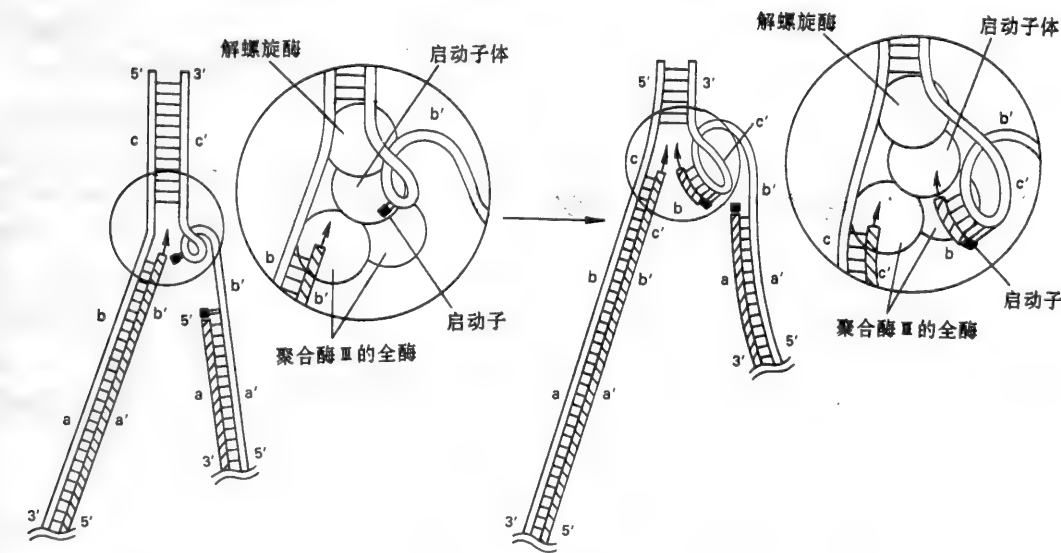
现在 DNA 聚合酶 III 全酶就在复制叉上, 它在此利用由引物酶合成的 RNA 开始合成前导链 (前图 24-44)。在聚合酶前头的双链 DNA 由解螺旋酶 (rep 蛋白) 解链, 此蛋白由 ATP 推动, 就像在起始部位的 dnaB 蛋白一样。单链结合蛋白再次保持解链的 DNA 处于伸展状态并易被接近, 因此两条链均能起模板作用。前导链是由加工能力极强的 DNA 聚合酶 III 的作用连续不断地合成的。DNA 促旋酶则同时引入负超螺旋, 以避开拓扑学上的危机。

后续链的合成方式更为复杂。如前所述, 后续链是一段一段合成的, 所以  $5' \rightarrow 3'$  的聚合导致  $3' \rightarrow 5'$  方向的总的生长。这可由用于后续链的模板形成环而完成 (图 III-27-43)。那末后续链的模板就要通过二聚的聚合酶 III 的一个亚基的聚合酶部位, 其通过的方向与另一亚基中前导链模板的方向相同。DNA 聚合酶 III 应在大约 1000 个核苷酸已加在后续链上之后, 一定让后续链的模板走开。然后就应形成一新的环, 而引物酶应再合成一短段的 RNA 引物, 以便另一冈崎片段的合成能够开始。新生的后续链中的缺口则由 DNA 聚合酶 I 来填满, 它也利用其

5'→3'核酸外切酶活性来移去聚合酶部位前头的核糖核苷酸引物(图Ⅲ-27-44)。最后,DNA连接酶将各片段连接起来。

表Ⅲ-27-3 大肠杆菌的 DNA-复制蛋白

蛋白质	作用	大小 (kd)	分子数/细胞
dnaB 蛋白	开始给双螺旋解螺旋	300	20
引物酶	合成 RNA 引物	60	50
rep 蛋白	将双螺旋解开	65	50
SSB	使单链区稳定化	74	300
DNA 促旋酶	引入负超螺旋	400	250
DNA 聚合酶Ⅲ全酶	合成 DNA	~800	20
DNA 聚合酶Ⅰ	抹去引物并填满缺口	103	300
DNA 连接酶	连结 DNA 的末端	74	300



图Ⅲ-27-43 用于后续链合成的模板形成环,这使得复制叉上的二聚的DNA聚合酶Ⅲ全酶能够合成两条子链。

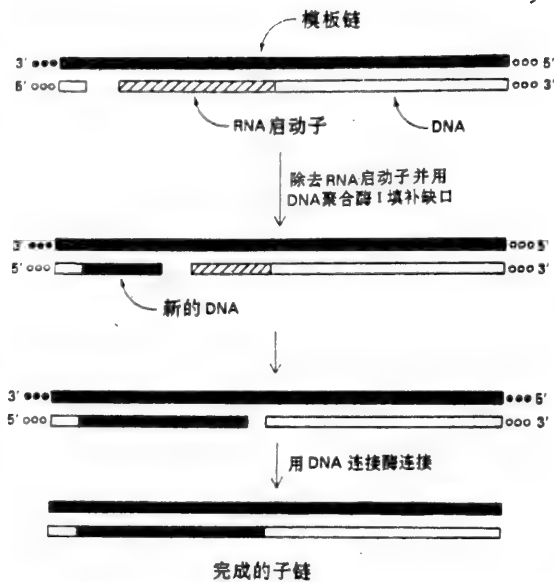


图 27-44 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 核酸外切酶活性除去 RNA 引物。然后此酶的聚合作用将子链中的缺口填满。DNA 连接酶催化最后的连接步骤。

## 第 28 章 基因重排：重组和易位

(上略) **易位子** (transposon, 或译转座子) 是可移动的遗传因素, 它使得基因能在 DNA 中的非同源部位之间移动。R-因子质粒是医学上重要的一类易位子, 它们能使细菌对许多种抗菌素产生抗性。

一般的重组在 DNA 的修复中起着关键作用。当双链中的两股链都被破坏时, 修复的信息必须来自另外的 DNA 分子。重组提供了模板来合成 DNA, 以弥补这一空缺。不能进行重组的突变体的 DNA 极易受到紫外线和与 DNA 反应的药剂的可逆伤害。重组和易位也产生基因的新组合。他们在进化中极为重要, 因为他们显著地增多了可能遗传的因素, 而自然可从其中选择。基因重排的第三个功能是调节 DNA 的表达。一个基因活跃与否, 决定于它在染色体中的位置和取向。(下略)。

### recA 蛋白催化一般重组中由 ATP 推动的 DNA 链的交换

到此为止所讨论的过程称为**一般重组**, 因为交换可在亲本 DNA 分子的任何一对同源的顺序之间发生。DNA 的单链区是由双链中的一条链的切断而来的; 它在第二个双链中找到一同源的顺序, 与互补链配对, 并代替另一个。在大肠杆菌中, 一般重组依赖于 rec 基因。recA 的产物 **recA 蛋白** 催化此链-同化反应, 它是由 ATP 的水解推动的。产物由一个双链和一条被取代的单链组成, 其形状如字母 D, 因此称为 **D-环结构** (前图 31-8)。在 recA<sup>-</sup> 突变体中重组的频率比野生种中低 10<sup>4</sup> 倍, 这一发现揭示了 recA 蛋白在一般重组中的中心作用。

**rec A 首先与单链 DNA 的一个区域 (ss DNA) 结合。**recA 分子围绕着 ssDNA 形成一条丝, 其化学计量关系为每 4 个核苷酸一个 38kd 的单体。这一 **recA-ssDNA 的丝** 再与双链 DNA 相结合。两个 DNA 分子都可安置在这条丝内, 其直径约为 100 Å。ssDNA 的存在显著地促进了对双链 DNA 的收载, 这是诱导契合的一个非常清晰的例子。**recA 蛋白迅即对双链 DNA 进行筛选, 寻找与 ssDNA 互补的顺序。**双链 DNA 部分被打开, 以有利于其碱基顺序的阅读。在这一复合物中双螺旋的一转含有 18.6 个碱基对, 而 B-DNA 中有 10.4 个。在 recA 蛋白的唯一的结合部位中, ssDNA 和双链 DNA 大概是彼此相邻的。当找到互补顺序后, 双螺旋进一步解链, 以开动碱基配对。现在 ssDNA 与靶子双链中的那一互补链配对。一旦这样开始了, 链的交换就继续进行, 这一过程称为**分支移动 (branch migration)**。

**recA 蛋白的重组作用是由 ATP 的水解供应能量。**自由能转换在分子细节上的机理尚不明了。不过, 已经知道几个关键之处。DNA 接合到 recA 蛋白上需要 ATP。结合的 ATP 的水解使得 recA 蛋白能从 DNA 上解离下来。当结合的 ATP 被水解时, 丝中的 recA 单体能够结合和释放 DNA。这样的反应循环使人想起 DNA 促旋酶的作用。我们将在蛋白质合成 (第 36 章) 和肌肉收缩 (第 36 章) 中遇到类似的特点。另一关键之处是 recA 丝有极性。其次, 它在 ssDNA 上单方向地 (5'→3') 组装。recA 的这些特性使得它能催化单方向的链的同化。recA 丝和入侵的 ssDNA 共同移动的推动力是结合的 ATP 的水解。不输入自由能, 入侵的 ssDNA 就会向左爬

行几步、又向右走爬行几步,进行一种无目的随机的爬行。单方向的、加工能力强的运动还有另一重要功能:它使得入侵的 ssDNA 链能越过靶子双链中不与它互补的受到伤害的区域。ATP 水解还由于使双链 DNA 分子围绕着丝旋转而促进分支移动。重组的机械化学(mechanochemistry)是引人入胜和富有挑战性的研究领域。

## rec BCD 的解螺旋作用和核酸内切酶作用 产生了用于重组的单链 DNA

重组要求入侵的 DNA 是单链的。为此目的,ssDNA 是怎样形成的呢?遗传学的研究证明,recB、recC 和 recD 这些基因在重组中都是重要的。事实上,这些基因编码的蛋白形成 328kd 的 **recBCD 复合物**。单独的 recB 蛋白催化由 ATP 推动的双链 DNA 的解链,而 recD 本身则是核酸酶。recBCD 复合物以一种有趣的方式,从双链产生 ssDNA。此复合物连在一线状双螺旋链的一端,并将其解开。ATP 的水解为解链供应能量,其速度为每秒钟约 300 个核苷酸。在后端发生 DNA 的重新缠绕,但比前端的解开慢些。因此,从复合物上伸出了两条单链环,而且随着酶在 DNA 上向前移动,环越来越大。

在称为 **chi** 的专一顺序处发生酶切。大肠杆菌的染色体大约有 1000 个 **chi** 部位,每个约 4kb。被识别的顺序为



rec BCD 在距此顺序 3' 端 4 和 6 个核苷酸之间切断此 DNA 链的主链。酶复合物继续向前移动,并将 DNA 解链,产生单链 DNA,同源的双链又可侵入此单链 DNA。

**单链结合蛋白** (SSB, single-strand-binding protein) 参与一般重组以及 DNA 复制。SSB 与单链 DNA 的协同结合防止了发夹环的形成。在 recA 蛋白与未成对的 DNA 链形成丝之前,SSB 使此链稳定化。**拓扑异构酶 I** 在重组中也起重要作用,它解除扭力的张力,在分支移动过程中一条 DNA 分子缠绕另一条时产生这种扭力。

## DNA 的损伤引发 SOS 反应,此反应是由一种 阻遏蛋白的水解发动的

一个大肠杆菌细胞通常有数百个拷贝的 recA 蛋白。在重组中随着 DNA 的伤害,这种关键性酶的水平要增加上百倍。真的,伤害迅速诱导 15 种以上的蛋白质的合成,这些蛋白质是与 DNA 修复有关的。修复机构的这种开动称为 **SOS 反应** (SOS response)。在正常情况下,修复蛋白以低水平存在,因为其信使 RNA 的合成被称为 **lexA** 的阻遏蛋白所阻断。SOS 反应的实质是 **lexA** 蛋白的酶切。由损伤的 DNA 所产生的单链 DNA 起着引发作用,它与 recA 蛋白结合!然后 ssDNA-recA 复合物水解 **lexA** 蛋白中的丙-甘键,这就破坏了这种蛋白阻断转录的能力,使它不能阻断许多与修复有关的基因的转录。因此,recA 蛋白是多功能的——它既是蛋白酶,又是**重组酶** (recombinase)。这样 recA 蛋白的合成也被解放了,因为 recA 基因的表达通常是由 **lexA** 阻遏物所阻断的。这种阻遏物的破坏也导致 ssB 和 **uvrABC** 复合物的合成加强,uvrABC 复合物是核酸酶,它切去胸嘧啶的二聚体。



易位子是极易移动的遗传因子

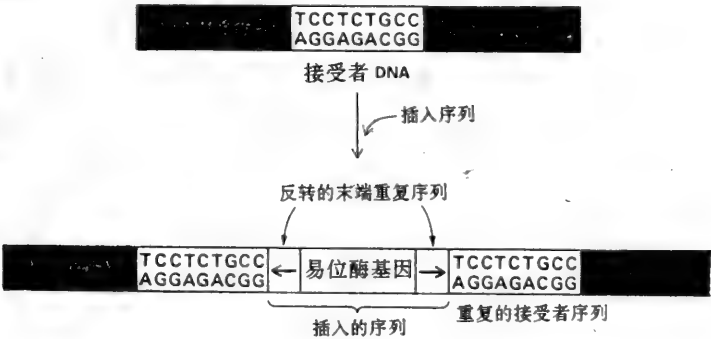
像 R-因子质粒这样的可移动的遗传因子称为**易位子**。它们之所以有如此高的移动性，结构基础是什么呢？最简单的易位子是**插入顺序**（IS，inserted sequence），典型的长约 1000 碱基（见表Ⅲ-28-2）。有些编码**易位酶**，其它一些则编码易位酶和仅仅另外一种蛋白质，这是移

表Ⅲ-28-2 大肠杆菌中一些易位子的性质

类 型	长度 (bp)	重复的接受者长度 (bp)	功能 (易位之外)
<b>插入顺序</b>			
IS 1	768	9	—
IS 2	1, 327	5	—
IS 4	1, 426	12	—
IS 5	1, 195	4	—
<b>复合的易位子</b>			
Tn3	4, 957	5	抗氨苄青霉素
Tn5	5, 700	9	抗卡那霉素
Tn2571	23, 000	9	抗多种抗体及 Hg

来源：J. Cullum, in J. Scaife, D. Leach and A. Galizzi, (eds.), *Genetics of Bacteria* (Academic Press, 1985), p. 86;  
N. Kleckner, *Ann. Rev. Genet.* 15(1981):341.

动所必需的。在 IS 相对两端的 20 左右个碱基对的顺序是非常相似的，但次序则相反。这些交界处的顺序称为**反向末端重复顺序**。IS 实际上可以移动到染色体上的任何位点上去。在易位时接受者部位变成重复的（图Ⅲ-28-22）。在易位前只出现一次的 4 至 12 个碱基对的顺序，在易位后则出现两次，IS 的每一侧各有一个。**重复的接受者顺序**是非反向的重复顺序。在这些侧面的顺序和 IS 的末端顺序之间没有同源性。而且，rec 基因的产物并不参与易位。而是 IS 的反向末端重复顺序与其本身的易位酶结合，此酶是专一性很强的核酸酶，它造成供体部位



图Ⅲ-28-22 插入顺序，由一个易位子的基因和两个反向末端重复顺序组成。易位导致接受者 DNA 的短的顺序的重复。

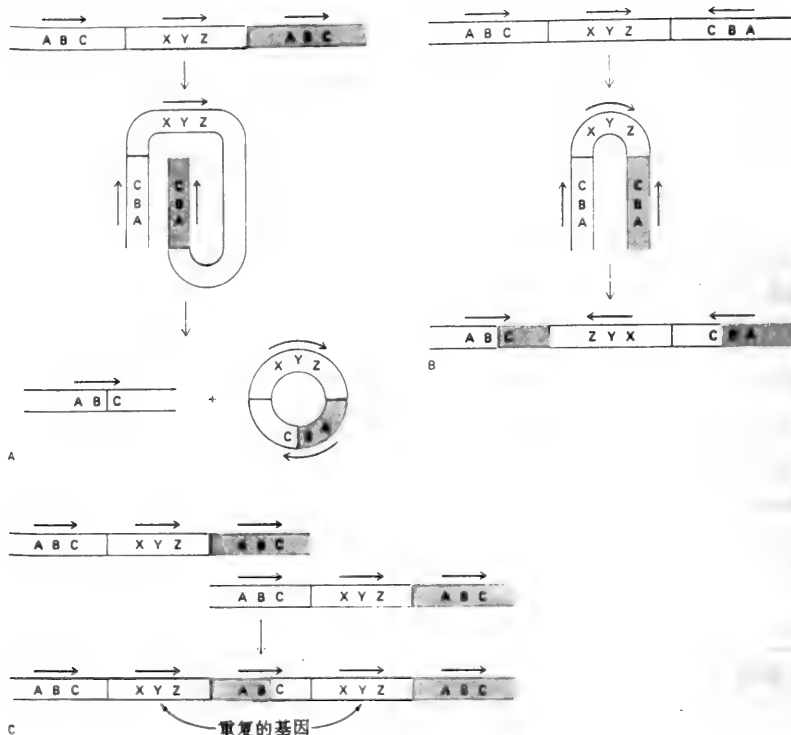


图 Ⅲ-28-23 完全相同的插入顺序（以浅阴影和深阴影表示）的重组，导致位于它们之间的基因（无阴影）的：（A）缺失或（B）倒置。插入顺序的方向决定着最后结果。（C）在姊妹染色体上不同位点的插入顺序的交换会使基因出现重复。

和接受者部位上交错的切口。DNA 聚合酶 I 和 DNA 连结酶也是易位所必需的，它们在细菌中存在的频率是每代  $10^{-6}$  上下。

当有一插入顺序易位至其中间时，大多数基因均被钝化。不过，每一插入顺序均携带其本身的启动子以转录其易位酶基因。这种启动子有时促进相邻基因的表达。其次，插入顺序可以引起基因的缺失、倒置和重复（图 Ⅲ-28-23）。大肠杆菌的染色体含有几种插入顺序的多个拷贝。方向相同的两个完全一样的插入顺序之间的重组导致他们之间的基因被切除。反之，在两个方向相反的插入顺序之间的基因则由于相互的交换而倒置了。倒置可以使基因的表达发生根本的变化，沙门氏杆菌中一种类型的鞭毛蛋白转换成另一种便是一例（第 32 章）。在真核生物中，由插入顺序所结合的基因可由姐妹染色体的不相等的交换而发生纵列的重复。因此，易位子的存在使得基因组的大规模的、高频率的重排成为可能。

**复合的易位子**与插入顺序不同，它所含有基因除易位之外，还执行其他功能。例如，Tn3 是一种复杂的易位子，它含有  $\beta$ -内酰胺酶（lactamase）的基因，这种酶与对氨苄青霉素的抗性有关。它还含有易位酶和解酶（resolvase）的基因，解酶是催化两个插入顺序之间的重组的酶（图 Ⅲ-28-24）。Tn3 和其他易位子一样，含有反向末端重复顺序，并诱导接受者部

位上顺序的重复。很可能复合的易位子来自于那些与一对插入顺序结合的细胞中的基因。和多种抗菌素的抗性有关的 R - 因子质粒大概是由于几个易位子合到一起而出现的。

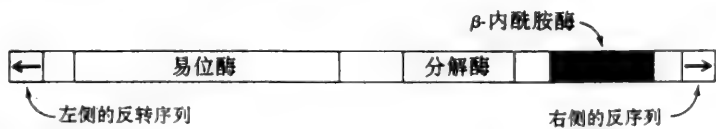


图 Ⅱ-28-24 Tn3 是一种复合的易位子, 由 3 种蛋白的基因组成, 这些基因是与反向末端重复顺序结合的。

质粒和噬菌体能与细菌的染色体交换成串的基因, 并彼此互相重组。已经证明一种抗四环素的因子能够从 R - 因子质粒移至沙门氏菌的噬菌体, 然后再到沙门氏菌的染色体中, 并由此再到  $\lambda$  噬菌体, 又到大肠杆菌的 *trp* 操纵子, 而后再回到  $\lambda$ 。这一令人瞩目的旅程着重指明了原核基因的高度移动性, 这一主题在真核生物中也会重现。

## 第 29 章 RNA 的合成和剪接

### 大肠杆菌的 RNA 聚合酶是由多个亚基组成的酶

大肠杆菌中的 RNA 聚合酶是一种非常大的 (450kd) 和极其复杂的酶, 它由 4 种亚基组成 (表 III-29-1)。称为全酶的整个酶的亚基组成为  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 。不久即将谈到,  $\sigma$  亚基有一启动子部位, 转录即从此开始; 它引发 RNA 的合成, 然后就与酶的其他部分分开。不带这种亚基的 RNA 聚合酶称为核心酶 ( $\alpha_2\beta\beta'$ ), 它含有催化部位。 $\beta'$  亚基与 DNA 模板结合,  $\beta$  亚基则与核糖核苷三磷酸底物结合。

表 III-29-1 大肠杆菌的 RNA 聚合酶的亚基

亚基	个数	质量 (kd)	作用
$\alpha$	2	37	未定
$\beta$	1	151	形成磷酸二酯键
$\beta'$	1	155	与 DNA 模板结合
$\sigma^{70}$	1	50	识别启动子, 并引起合成

大肠杆菌 RNA 聚合酶所催化的 RNA 的合成, 也和几乎所有的生物学聚合反应一样, 分三个阶段发生: 起始、延长和终止。在这一过程中 RNA 聚合酶执行着多种功能:

1. 它寻找 DNA 中的起始部位。大肠杆菌 DNA 有约 2000 个启动部位, 总共有  $4 \times 10^6$  个碱基对。
2. 它将一小段双螺旋 DNA 打开, 产生单链的 DNA 模板, 并由此得到指令。
3. 它选择正确的核糖核苷三磷酸, 并催化磷酸二酯键的形成。随着酶沿 DNA 模板单方向地移动, 这一过程重复多次。整个 RNA 聚合酶是加工能力强的——一个 RNA 聚合酶分子从头到尾合成一个转录本。
4. 它检测终止信号, 该信号确定转录本在何处终止。
5. 它与活化剂蛋白和阻遏物蛋白相互作用, 这些蛋白质在很大的动态范围内调节着转录的速率。基因表达主要是在转录水平上被控制的, 32 和 33 章将要讨论到。

### 转录从 DNA 模板上的启动子部位开始

转录在 DNA 模板上的启动子部位起始。已用几种办法鉴定了这些起始部位。一种办法是向 DNA 加入 RNA 聚合酶, 再加入脱氧核糖核苷酸酶。在没有核糖核苷三磷酸时, RNA 聚合酶一直结合在启动子上, 并保护它使不被消化。将未被保护的 DNA 长期消化之后, 产生约 60bp 的 DNA 片段。用称为印足迹 (footprinting) 的互补技术能够容易地鉴定出被保护区域的

位置和顺序。先用 $^{32}\text{P}$ 标记专一的 DNA 片段（例如，由限制性酶的作用产生的）的一 DNA 链的一端。将 RNA 聚合酶加于标记的 DNA 上，再用 DNA 酶 I 消化此复合物，消化时间是刚好使每条链上平均有一个切口。另一份不含 RNA 聚合酶的也用同样方法处理，以作对照。所产生的 DNA 片段则用电泳法依其大小分开。凝胶图谱（图 III-29-3）非常说明问题：对照样品中存在的一系列条带在含有 RNA 聚合酶的混合物中不见了。这些条带之所以消失，是因为 RNA 聚合酶保卫了 DNA 使那些本应发生的酶切没有发生，故未产生相应的片段。

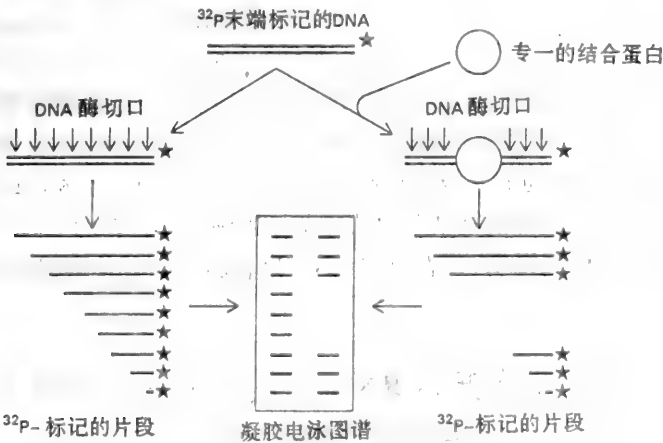


图 III-29-3 印迹技术。DNA 链的一端为 $^{32}\text{P}$ 所标记。然后此标记的 DNA 在少数部位上被 DNA 酶 I 切开。在一种蛋白质存在下进行同样实验，此蛋白质与 DNA 上专一的部位结合。结合的蛋白保卫了一段 DNA，使免受 DNA 酶的作用。因此，某些片段不存在。凝胶图谱中没有的片段就是 DNA 上的结合部位。

DNA 顺序的第一个核苷酸（起始部位）以+1 代表，第二个为+2；在起始部位之前的核苷酸为-1。这些符号所代表的是 DNA 的编码（有意义的）链，而不是模板链（无意义的，anti-sense）；编码的链的顺序与 RNA 转录本的相同，不过 T 代替了 U。许多原核的启动子的顺序有一个显著的特点。在起始部位的 5'-侧（上游）存在两个共同的顺序特点。它们称为-10 顺序（Pribnow 匣子）和-35 顺序，因为它们集中在起始部位上游约第 10 和第 35 个核苷酸处。这些顺序各长 6bp，这是从 100 种以上启动子的分析推导出来的，它们的共同顺序是：



启动子在效力方面相差很多。强的启动子引起频率很高的转录，大肠杆菌中每两秒钟一次。反之，启动子非常弱的基因十分钟才转录一次。大多数最强的启动子的-10 和-35 区域，其顺序与共同的特殊顺序极为相近，而弱的启动子则在这些部位趋向于有多个取代。实际上，在-10 或-35 顺序中有一个碱基发生突变就能使启动子的活性丧失。这些保守的顺序之间的距离也是重要的，离开 17 个核苷酸是最适的。许多基因的转录频率也受到调节蛋白的显著影响，这些蛋白质与启动子部位附近的顺序相结合，并与 RNA 聚合酶相互作用（见第 32 和 33 章）。

## 热休克基因是由一种特殊的 $\sigma$ 亚基识别的

近年来的研究已阐明,大肠杆菌有不止一种西格玛 ( $\sigma$ ) 亚基。识别上述专门顺序的是称为  $\sigma^{70}$  的,因为其质量为 70kd。当温度突然升高时,大肠杆菌的反应是合成一系列**热休克蛋白** (heat-shock proteins),它们使细菌能适应这种挑战。热休克基因的启动子的-10 顺序与标准启动子的极为不同。热休克启动子的-35 区域与一般启动子的相似,但也有其显著特点。下面是大肠杆菌的热休克启动子与其标准启动子的-35 和-10 区域的顺序的比较:

热休克启动子

5'...TNNCNCNCTTGAA.....CCCATNT.....3'

标准启动子

5'...TTGACA.....TATAAT.....3'

含有另一种西格玛亚基 (称为  $\sigma^{32}$ ) 的全酶识别热休克启动子。当温度突然升高时,  $\sigma^{32}$  的水平显著增高,这导致一系列保护性蛋白的合成。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 也利用西格玛亚基的变化作为一种发育的装置。不同的  $\sigma$  因子控制着这种细菌的芽孢的形成,此因子决定着哪一组基因被表达。同样, SPO 1 这种侵染枯草菌的噬菌体则编码几种新的  $\sigma$  因子,它们会引起病毒基因的顺序表达。这些发现说明,  $\sigma$  在决定 RNA 聚合酶在何处使转录开始方面起着关键作用。

## RNA 聚合酶在开始 RNA 合成之前先将模板 DNA 螺旋解开将近两转

在寻找启动子部位时, RNA 聚合酶结合在双螺旋 DNA 上。然而, 双链 DNA 不能充作 RNA 合成的模板, 因为其碱基已经配对。双链 DNA 中必须有一个区域是不配对的, 这样它的一股链上的核苷酸才变得可与过来的核糖核苷三磷酸发生碱基配对。DNA 模板链选择正确的核糖核苷三磷酸, 方法是与它形成沃森-克里克碱基对, 像在 DNA 合成中一样。RNA 聚合酶将 DNA 解螺旋到什么程度呢? 分析酶对环状双链 DNA 形成超螺旋的影响, 回答了这个问题。将不同量的 RNA 聚合酶加于 DNA。拓扑异构酶 I 是催化双链 DNA 发生协同切口 (concerted nicking) 和重行封口 (resealing) 的酶, 将此酶加入, 以使环状 DNA 中不与聚合酶分子接触的那一部变得松弛。去掉结合的蛋白质之后, 用凝胶电泳分析这些 DNA 样品。结果形成负超螺旋的程度与结合在每个模板 DNA 上的 RNA 聚合酶的数目成正比, 这说明此酶把 DNA 的螺旋解开了。每一结合的聚合酶使 17bp 片段解链, 这相当于 B-DNA 双螺旋中的 1.6 转。

环状 DNA 模板中负超螺旋的形成有利于许多基因的转录, 因为它使解链容易了。因此, 由 DNA 促旋酶向 DNA 引入负超螺旋能增加位于远处的启动子的效率。不过, 并非所有的启动子都为负超螺旋所促进。DNA 促旋酶的启动子就是一个值得注意的例外情况。这一基因的转录速率因负超螺旋的形成而降低, 这是一种巧妙的反馈控制, 它保证 DNA 不会发生过度的超螺旋化。负螺旋的形成是由于改变了一10 和一35 区域之间的角度, 而降低此启动子的效率。

从**封闭的启动子复合物** (其中 DNA 为双螺旋) 转变到**开放的启动子复合物** (其中 DNA 被部分解链) 是转录中的关键性事件。为新的 RNA 链的第一个磷酸二酯键形成的舞台, 现在已准备就绪了。

## 延长在转录鼓泡上进行，鼓泡沿 DNA 模板移动

RNA 合成的延长阶段开始于第一个磷酸二酯键形成之后。重要的变化是丢失  $\sigma$ ——没有  $\sigma$  的核心酶与 DNA 模板结合得更牢。RNA 聚合酶确实一直停留在其模板上，直至达到结束信号为止。含有 RNA 聚合酶、DNA 和新生的 RNA 的区域称为**转录鼓泡** (transcription bubble)，因为它含有一局部解链的 DNA “泡”(图 III-29-11)。新合成的 RNA 与模板 DNA 链形成一杂交的双螺旋。此 RNA-DNA 螺旋长约 12bp，这大概相当于 A-DNA 类型的螺旋中的一转。此杂交螺旋中的 RNA 的 3'-羟基的位置是这样的：它能对进来的核糖核苷三磷酸的  $\alpha$  磷原子进行攻击。核心酶还有对另一股 DNA 链的结合部位。在整个延长过程中，DNA 中约有 17 个 bp 被解开，和在起始阶段一样。延长的速率大约是每秒钟 50 个核苷酸；在此时间内转录鼓泡移动 170Å 的距离。

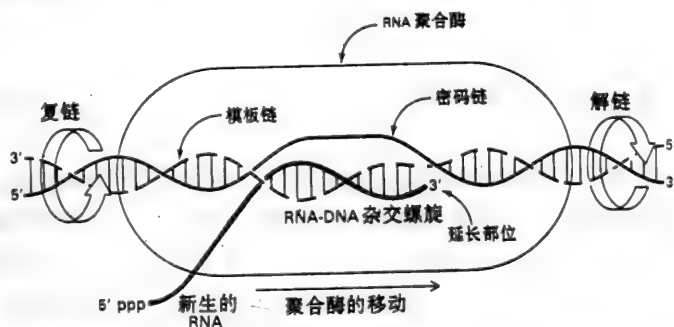


图 III-29-11. RNA 转录本延长过程中转录鼓泡的模型。模板 DNA 链为虚线，起编码作用的 DNA 链为细线，新生的 RNA 链为粗线。双链 DNA 在 RNA 聚合酶前进的方向被解开，而在其后端则重新卷起。RNA-DNA 杂交螺旋以同步旋转。

当 RNA 聚合酶沿着 DNA 模板移动时，杂交的 RNA-DNA 的长度以及 DNA 的未解开的区域的长度均保持不变。这一发现指明，在 RNA 聚合酶后面的 DNA 重新卷成螺旋的速率和聚合酶前面它被解开的速率是一样的(图 III-29-11)。每次加入一个核苷酸时 RNA-DNA 杂交双链必须旋转，以使 RNA 的 3'-OH 停在催化部位上。杂交双链的 12bp 的长度恰好短于双螺旋中完全的一转，这可避免打结的问题。恰好在形成完全的一转之前，RNA 链弯曲得很厉害，离开了模板 DNA，这就防止了 RNA 的 5'-末端不会与 DNA 相互缠绕在一起。

重要的是应注意到，RNA 聚合酶没有核酸酶活性。与 DNA 聚合酶相反，它不对新生的多聚核苷酸链进行校对。当然，转录的准确程度比复制的要低得多。RNA 合成中出现错误的频率是每  $10^4$  或  $10^5$  中有一个错误，这是 DNA 合成中错误的  $10^5$  倍。RNA 合成的这种低得多的准确性是能够忍受的，因为错误不会传给后代。对于大多数基因，每一代合成许多 RNA 转录本；极少数有缺陷的转录本大概不会有害。

## 几个 U 残基之后的 RNA 发夹引起转录的终止

在转录的终止阶段，磷酸二酯键的形成停止，RNA-DNA 杂交链解离，DNA 的解链区重

新绕起来, RNA 聚合酶把 DNA 释放出来。转录的终止也像它的起始一样, 是受到精确控制的。DNA 模板的转录区含有终止信号。最简单的一种就是回文的富于 GC 的区域, 随后是富于 AT 的区域 (前图 25-17)。这种 DNA 回文结构的 RNA 转录本自我互补的。因此, 其碱基可以配对形成发夹结构, 有茎、有环, 它的高的 GC 残基含量有利于此结构的形成 (前图 25-18)。回忆一下, G-C 碱基对要比 A-T 碱基对稳定。这一稳定的发夹之后便是 4 个或更多个 U 残基的顺序。RNA 转录本就在其中或其紧后结束。

这种发夹-寡-U 结构如何终止转录呢? 首先, 似乎很可能的是, 当 RNA 聚合酶遇到这种发夹时就停步不前。其次, 在发夹之后所产生的 RNA-DNA 杂交螺旋不稳定, 因为它含有 rU6dA 碱基对, 这是 4 种碱基对中最弱的。因此, 新生的 RNA 从 DNA 模板上解离下来, 然后就离开了酶。现在孤零零的 DNA 模板就重新与它的伙伴结合, 并在鼓泡区域内重新形成 DNA 双链。核心酶 (没有  $\sigma$ ) 对双股 DNA 的亲合力要比对单链 DNA 的小得多, 因而 DNA 就被释放出来了。西格玛重新与核心酶结合形成全酶, 全酶又能再寻找启动子部位, 以开始新的转录本。

### 真核生物中转录和翻译在空间上和时间上是分开的

现在我们来讨论真核生物中的转录, 这是比原核生物中的复杂得多的过程。按照定义, 真核生物有一为膜所包被的核, 转录就在其中进行。翻译则相反, 在核外面进行。因此, 真核生物中转录和翻译在细胞的不同区域中发生, 而在原核生物中则它们是密切相连在一处发生的 (图 III-29-20)。事实上, 当细菌 mRNA 的转录本还在合成时, 其翻译就开始了。转录和翻译在空间上和时间上的分隔使得真核生物能够以精巧得多的方式调节基因表达, 这就增进了真核生物在形式上和功能上的丰富多彩。

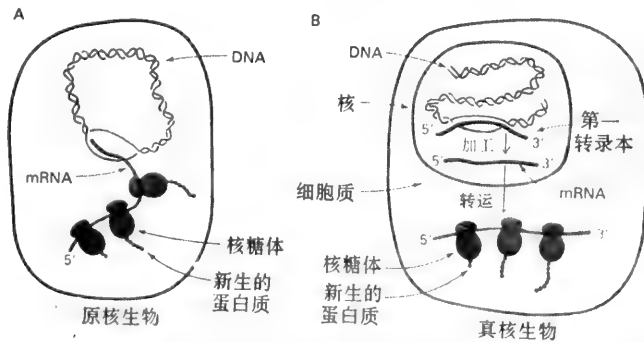


图 III-29-20 在原核生物中转录和翻译是密切相连的, 而在真核生物中它们在空间上和时间上都是分开的。(A) 在原核生物中, 原初的转录本就起着 mRNA 的作用, 而且立即被用作合成蛋白质的模板。(B) 在真核生物中, 在核中 mRNA 的前体被加工和剪接, 然后再被运至胞浆中。[据 J. Darnell, H. Lodish, and D. Baltimore. *Molecular Cell Biology* (Scientific American Books, 1986), p. 270.]

原核生物与真核生物之间第二个主要的区别是真核生物在新生的 RNA 真正变成 mRNA 之前先要对它进行非常广泛的加工。原初的转录本——即 RNA 聚合酶作用的产物——在其



5'端得到一个帽子，在其 3'端获得一 poly A 的尾巴。最为重要的是，高等真核生物的几乎所有的 mRNA 前体都要被剪接。内含子被从原初转录本中被切除，以形成一成熟的 mRNA，它带有连续的信息。有些 mRNA 是其前体的十分之一那么大，前体可能大到 30kb 或更大。某些原初转录本的剪接式样是在发育过程中被调节的，这就可以在同一主题下发生变化，如一种抗体分子就有与膜结合的形式和分泌的形式。不同的剪接增加了真核生物中蛋白质的种类。

真核基因表达的另一个值得注意的特点是大部份转录本在细胞核内就降解了。mRNA 是由一类称为不均一核 RNA (hn RNA) 衍生而来的。然而，只有 20%hn RNA 分子被转变为 mRNA，其余的则在它们形成后数分钟之内就被核酸酶水解了。有趣的问题是，为什么真核生物要保留这样一种看来是浪费的过程。

### 真核细胞中 RNA 是由 3 种 RNA 聚合酶合成的

在原核生物中，RNA 是由一种聚合酶合成的。在真核生物中则不同，其细胞核中有三种类型的 RNA 聚合酶，它们之间的差别在于对模板的专一性、在核中的定位和对抑制剂的敏感性（表 III-29-2）。RNA 聚合酶 I 位于核仁中，它在其中转录 18S、5.8S 和 28S 核糖体 RNA 的基因的纵列簇（tandem array）。其它核糖体 RNA 分子（5S rRNA）和所有的转移 RNA 分子均由聚合酶 III 合成，它位于核原生质中而不是核仁中。信使 RNA 的前体由 RNA 聚合酶 II 合成，它也位于核原生质中。几种小的 RNA 分子，如剪接器中的 U1snRNA，也是由聚合酶 II 合成的。

表 III-29-2 真核的 RNA 聚合酶

类 型	定 位	细胞的转录本	鹅膏蕈碱的影响
I	核仁	18S、5.8S 和 28S rRNA	不敏感
II	核原生质	mRNA 前体和 hnRNA	强烈地被抑制
III	核原生质	rRNA 和 5S rRNA	被高浓度抑制

真核的 RNA 聚合酶也和原核的聚合酶一样，催化的是进来的核糖核苷三磷酸对生长中的 RNA 链的 3'-OH 上  $\alpha$ -磷原子的攻击。仍然不需要引物，合成沿 5'→3' 的方向，按照反平行的 DNA 模板链所发出的指令进行。真核的 RNA 聚合酶也没有核酸酶活性，这意味着新生 RNA 中的错误不能被改正。关于真核聚合酶的亚基的研究以及这些亚基的作用的研究仍处于初期阶段。这些酶是大的多个亚基的复合物（>500kd），由两个大亚基（~140kd 和 ~200kd）和几个小亚基组成。（下略）。

### 真核的启动子含有 TATA 匣子和另外的上游顺序

RNA 聚合酶 II 的启动子，也和细菌聚合酶的一样，位于转录起始部位的 5'侧。诱发突变的实验和许多高等真核基因的比较均表明，几个上游的区域是重要的。距起始部位最近的一个，集中在-25 处的，称为 TATA 匣子（Hogness 匣子）。共同的顺序是 A 和 T 残基的七核苷酸。比较 100 多种真核生物的启动子，得知其共同的顺序如下：

5'T<sub>82</sub>A<sub>87</sub>T<sub>93</sub>A<sub>85</sub>A<sub>83</sub>A<sub>88</sub>A<sub>50</sub>3'

每个字母右下角的数字表示该碱基在此位置出现的频率(百分数)。在这些位置上第二种最常见的碱基及其出现频率如下:

5'A<sub>7</sub>T<sub>2</sub>A<sub>7</sub>T<sub>10</sub>T<sub>37</sub>T<sub>10</sub>T<sub>33</sub>3'

在酵母中,集中在-30和-90之间的TATAAA顺序起着同样的作用。TATA匣子存在于几乎所有产生mRNA的真核基因中。注意,真核生物的TATA匣子与原核生物的-10顺序(TATAAT)极为相似,不过距起始部位较远。在TATA匣子中一个碱基的突变显著地降低其启动活性。同样,A和T两种碱基的相互交换也引起活性的丧失,说明必要的是准确的顺序,而不仅仅是AT对的含量高。大多数TATA匣子的侧面是富于GC的顺序。

TATA匣子是启动子活性所必需的,但通常并不是充分的条件。在-40和-110之间还有更多的因素。许多启动子含有CAAT匣子,有些含有GC匣子。CAAT匣子的共同顺序如下:

5'GGNCAATCT3'

GC匣子的如下:

5'GGGCGG3'

组成基因(连续不断地表达的基因,不受发育的调节)的启动子中常有GC匣子。这些上游顺序的位置因启动子而异,与原核生物中-35区域的位置十分固定不同。另一区别是,CAAT匣子和GC匣子当存在于模板链上时也有作用,与-35区域不同。

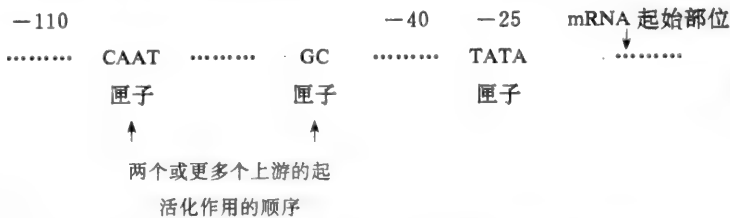


图 III-29-24 高等真核生物中 mRNA 前体的启动子的一般特性。

## 称为转录因子的特殊的蛋白质与真核的启动子相互作用

真核基因中上游的起促进作用的顺序的多种多样性以及其位置的变化多端说明它们可能是由不同的专一的蛋白质识别的,而不是由一种聚合酶所识别的。情况果真如此。RNA 聚合酶本身不能识别启动子部位,也不能开始转录。然而,加入细胞提取物就能恢复这种能力。几种特殊的起促进作用的蛋白质正在被分离出来,它们称为**转录因子**,它们的位置也正在用印足迹实验进行确定。例如,哺乳动物细胞中的 Sp1,一种 95kd 或 105kd 的蛋白质,就是其启动子含有 GC 匣子的基因的转录所必需的。SV40 病毒(致癌病毒,感染猴子的细胞)在距起始两侧各 50 至 100bp 处有 5 个 GC 匣子。DNA 酶 I 消化的印足迹实验表明 3 个 GC 匣子与 Sp1 结合牢固,2 个结合疏松(图 III-29-25)。结合一分子 Sp1 能保护 DNA 中的大约 20 个 bp (~68 Å),使其免被消化。

最近还鉴定出了几种其他的转录因子。哺乳动物细胞中的 CTF (结合 CCAAT 的转录因

子)是 60kd 的蛋白质,它与 CAAT 匣子结合。果蝇中的 B 蛋白与 TATA 匣子结合而促进转录。在突然增高温度之后,果蝇中一种热休克转录因子 (HSTF) 就会表达出来。从距 TATA 匣子上游 15bp 部位开始的热休克基因的启动子是与多个拷贝的 HSTF 结合的 (图 III-29-25)。HSTF 与大肠杆菌的热休克蛋白  $\sigma^{32}$  不同, HSTF 是直接结合在热休克基因的靶子部位上,而不是首先与 RNA 聚合酶结合在一起。在酵母中, gal4 蛋白促进 3 种基因的转录,它们是为代谢半乳糖的 3 种酶编码的。gal4 蛋白是与这些基因的启动子中专一的上游顺序结合而起作用的。

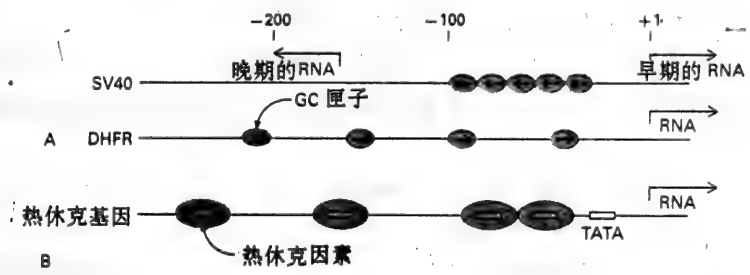


图 III-29-25 真核启动子中转录因子的多个结合部位。

- (A) Sp1 结合到二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的启动子上和 SV40 病毒 DNA 的启动子上。
- (B) HSTF 结合到果蝇的热休克启动子上。[据 W. S. Dynan and R. Tijan, *Nature* 316 (1985): 774.]

## 促进子顺序能在距起始部位数千碱基远处促进转录

高等真核生物的许多启动子的活性为称为**促进子** (enhancer) 的顺序所促进, 促进子本身

并无启动子活性。值得注意的是, 促进子能在距离数千碱基对之远处起到促进作用。它们可能在上游、在下游, 或者甚至在被转录基因之中。SV40 病毒的促进子是一 72bp 的纵列重复顺序, 把它放到 5.2kb 的环状病毒基因组中任何地方均有活性。而且, 促进子无论是位于起编码作用的链上、还是位于模板链上, 都能起作用。

一特定的促进子只有在某些种细胞中才有作用。免疫球蛋白的促进子只在 B-淋巴细胞中, 而不在任何其它地方起作用。促进子的作用要求那些只在某些细胞中表达的蛋白质。传递糖皮质激素的激素作用的促进子最好地说明了这个问题。这些固醇与可溶性受体相互作用。激素-受体复合物结合到促进子上就

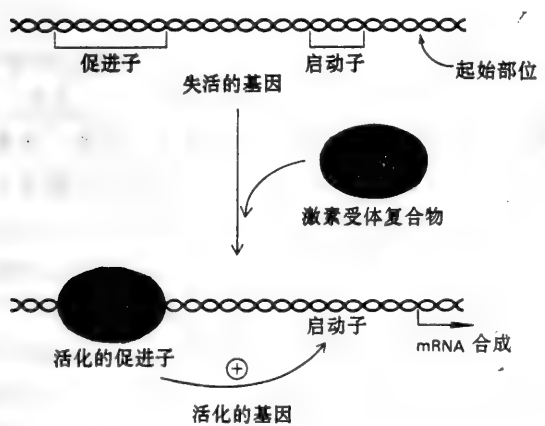


图 III-29-26 促进子顺序在传递固醇激素的作用方面起关键作用。糖皮质激素与可溶的受体蛋白结合。这一复合物再与促进子顺序结合, 使得它们能促进对激素起反应的基因的转录。

这些固醇与可溶性受体相互作用。激素-受体复合物结合到促进子上就

会引起对一组特殊基因转录的促进。如所预期,感染真核细胞的病毒 DNA 通常含有的促进子是为寄主细胞的蛋白质所活化的。例如,小鼠乳房瘤病毒 (MMTV, mouse mammary tumor virus) 的 DNA 就含有糖皮质激素的促进子。因此,MMTV 在那些通常为这些固醇类所刺激的细胞中蔓延——即在乳腺的上皮细胞中蔓延——因为这些细胞含有活化促进子的激素受体复合物。病毒的寄主范围之所以有限,部分地是由于病毒具有组织专一的和种专一的促进子。

促进子如何在数千个碱基之外起作用呢? 一种有吸引力的假说是它们起着“码头”的作用,含有 RNA 聚合酶 II 的起始复合物的组装在这种“码头”中进行。由于与起调节作用的蛋白结合, DNA 可能形成环,所以在链状顺序中距离远的部位可能变得很近了。这一引人入胜的问题亟待详细的答案。促进子和上游的起活化作用的顺序的发现打开了大门,便于了解真核细胞中基因是如何有选择地表达的。与这些调节顺序相结合的转录因子和其他蛋白质可以被看作是口令,他们共同合作,打开了多重的锁,使得 RNA 聚合酶到达专一的基因。

### 在转录过程中 mRNA 的前体得到 5' 帽子

像在原核生物中一样,转录通常从 A 或 G 开始。然而,新生的 RNA 链的 5'-磷酸末端几乎立即就被修饰了。水解释放一个磷酸。然后,二磷酸的 5' 末端攻击 GTP 的  $\alpha$ -磷原子,形成一极不寻常的 5'-5'三磷酸键。这种极为特别的末端称为帽子。末端的鸟嘌呤的 N-7 然后被 S-腺苷基甲硫氨酸甲基化,形成帽子 0 (cap 0)。相邻的核糖也可能被甲基化形成帽子 1 和帽子 2 (前图 29-32)。这些帽子对以后的剪接反应是重要的。它们也对 mRNA 的稳定性有贡献,因为它们保护了其 5' 端,使不受磷酸和核酸酶的作用。此外,帽子还促进真核的蛋白质合成系统对 mRNA 的翻译。转移 RNA 和核糖 RNA 分子没有帽子。

### 在被核酸内切酶切开后, 3'-多腺苷酸尾被加到大多数 mRNA 上

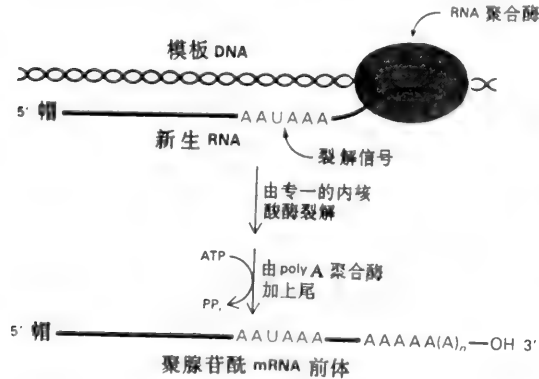


图 29-28 原初转录本的酶切和多聚腺苷酸化。专一的核酸内切酶在 AAUAAA 的下游将 RNA 酶切。然后 polyA 聚合酶将约 250 个 A 残基加上。

假若其 3' 侧的这一顺序或约 20 个核苷酸的一段没有了,就不会发生酶切。另一条线索就是有些成熟的 mRNA 含有内部的 AAUAAA 顺序。这样, AAUAAA 仅仅是酶切信号的一部分,它

关于真核的终止信号所知甚少。有些含有发夹,其后是一系列 U 残基,像原核的转录本中那样。大多数真核的 mRNA 分子在其 3' 端有一多聚腺苷酸 (poly A) 的尾。这一 poly A 不是由 DNA 编码的。事实上, poly A 之前的核苷酸并非被转录的最后一个核苷酸。有些原初的转录本在成熟 RNA 的 3' 端之外还有数百个核苷酸。

真核的原初转录本是被专一的核酸内切酶所切断的,此种内切酶识别这一顺序: AAUAAA (图 29-28)。

的上下文也是重要的。被核酸内切酶切断之后，poly A 聚合酶将大约 250 个 A 残基加到转录本的 3'末端上，在此反应中 ATP 是供体。这一聚腺苷酸 (poly A) 尾然后就把几个拷贝的 78kd 结合蛋白包起来。

poly A 尾的作用是一个谜。其合成可由 3'-脱氧腺苷 (蛹虫草菌素 cordycepin) 所抑制，此药物并不干扰原初转录本的合成。没有 poly A 尾的信使 RNA 可被运至细胞核外，而且它也是蛋白质合成的有效模板。一类重要的 mRNA，即编码将 DNA 包装起来的组蛋白的 mRNA，并没有 poly A 末端。

mRNA 前体中的剪接部位是由内含子末端的顺序所专一化的

内含子会被准确地从 mRNA 前体中被剪接掉。在剪接点上剪去一个核苷酸就会引起剪接段 3'侧的密码位移，而产生一完全不同的氨基酸顺序。剪接机器怎样以高度的准确性对它的靶子进行加工呢？已知 RNA 转录本的千百个内含子-外显子接头处的碱基顺序，它们是富有启发性的 (表 III-29-3)。真核生物的这些顺序，从酵母到哺乳类越来越复杂，其共同的结构特点是：内含子的碱基顺序以 GU 始，而以 AG 终。脊椎动物内含子在 5'端的共同顺序是 AG-GUAAGU。在内含子的 3'端，共同的顺序是一串 10 个嘧啶 (U 或 C)，随后是任何一种碱，然后是 C，最后以不变的 AG 结束。内含子还有一内部的部位，在 3'剪接部位上游的 20 和 50 个核苷酸之间。它称为分支部位 (branch site)，其理由下文自明。在酵母中，分支部位的顺序差不多总是 UACUAAC；而在哺乳动物中，则已发现各种各样的顺序。

表 III-29-3 在含有内含子的转录本中剪接点的碱基顺序

基因区域	外显子	内含子	外显子
卵清蛋白内含子 2	UAAG	GUGAGC . . . . . UUACAG	GUUG
卵清蛋白内含子 3	UCAG	GUACAG . . . . . AUUCAG	UCUG
β-珠蛋白内含子 1	GCAG	GUUGGU . . . . . CCUAG	GCUG
β-珠蛋白内含子 2	CAGG	GUGAGU . . . . . CCACAG	UCUC
免疫球蛋白 λ <sub>1</sub> 内含子 1	UCAG	GUCAGC . . . . . UUGCAG	GGGC
SV40 病毒早期 T 抗原	UAAG	GUAAAU . . . . . UUUUAG	AUUC

5'和 3'剪接部位以及分支部位以外的那部分内含子在确定剪接于何处发生方面似乎是不重要的。内含子的长度从 50 至 10,000 核苷酸不等。一个内含子的许多部分可以被去掉，而不改变剪接的部位或效率。同样，将长的 DNA 顺序插入基因的内含子中也不影响剪接。而且，可用重组 DNA 的方法把一个内含子的 5'端接到另一个非常不同的内含子的 3'端上，而得到嵌合内含子。只要剪接部位和分支部位没有变化，它仍可被正常地剪接。反之，这 3 个关键区域中的任何一个发生了突变，就会引起异常的剪接。远离剪接的接头处的突变，只要其变化在一个新的位置上创造出 3'或 5'剪接的共同顺序，就会引起不正常的剪接。

地中海贫血是一类遗传性的贫血症，其特点是血红蛋白的合成有缺陷。这类贫血中有一些是由**异常剪接** (aberrant splicing) 引起的。在一个病人中，在第一个内含子的正常 3' 剪接部位 21 个核苷酸以外，由 G 变为 A 的突变就造成了一个新的 3' 受体部位。下图就是  $\beta$ -珠蛋白基因的内含子中发生了一个碱基的突变 (G 变 A) 而引起地中海贫血。这种突变大概产生了一个新的 3' 剪接部位，它与下游远处的正常剪接部位一样 (据 R. A. Spritz, et al, *Proc. Nat. Acad. Sci*, 78: 2457, 1981)。

正常的 内含子的正常 3' 端  
 $5' \text{CCTATTGGTCTATTTTCCACCC} \underline{\text{TTAGGCTGCTG}} 3'$   
 $\downarrow$   
 $\beta$ -地中海贫血  $5' \text{CCTA} \underline{\text{TTAGTCTATTTTCCACCCTTAGGCTGCTG}} 3'$   
 所产生的 mRNA 就含有一系列通常不存在的密码子。剪接部位后的第 7 个密码子是蛋白质合成的终止信号，所以异常的蛋白质尚未完成就停止了合成。

### 在 mRNA 前体的剪接中形成了套索式中间产物

mRNA 前体中一个外显子的尾如何与相邻外显子的头相连呢？剪接开始于上游的外显子 (外显子 1) 和内含子的 5' 端之间的磷酸二酯键的酶切 (图 III-29-31)。这一反应中起攻击

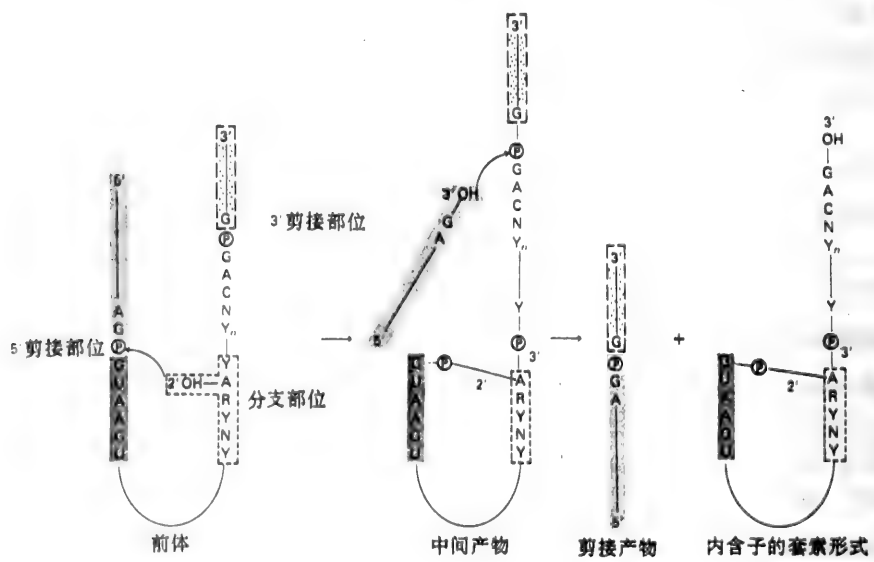
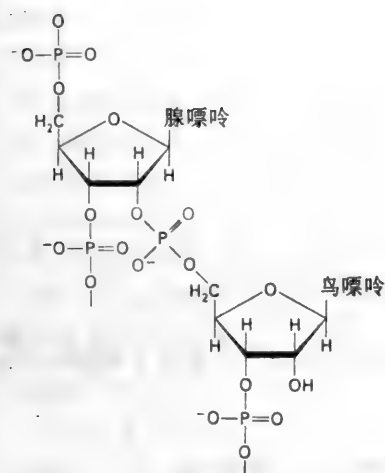


图 III-29-31 真核生物细胞核中 mRNA 前体剪接的机理。

上游的 (5') 外显子为浅阴影部分，下游的 (3') 外显子为有圆点的区域，分支部位则用虚线框起。Y 代表嘌呤核苷酸，R 代表嘧啶核苷酸，N 代表任何核苷酸。分支部位的腺核苷的 2'-OH 攻击 5'-剪接部位。然后上游外显子上新形成的 3'-OH 攻击 3' 剪接部位。外显子连结到一起，内含子则以套索的形式被释放出来。[据 P. A. Sharp, *Cell* 2 (1985): 3980.]



图Ⅲ-29-32 剪接中套索式中间产物中分支点的结构。这个腺苷酸残基通过磷酸二酯键与3个核苷酸相连。图中A与G间的是新的磷酸二酯键，A上的另两个是旧有的。

作用的基团是分支部位中一个腺苷酸残基的 2'-OH。在这个 A 残基与内含子的 5'-末端磷酸基之间形成 2',5'-磷酸二酯键。注意,这一腺苷酸残基还通过正常的 3',5'-磷酸二酯键与两个别的核苷酸相连(图Ⅲ-29-32)。因此在这一部位产生一个分支,并形成一套索式的中间产物(lariat intermediate)。

然后外显子 1 的 3'-OH 末端攻击内含子和外显子 2 之间的磷酸二酯键。外显子 1 和 2 连在一起了,内含子则以套索形式被释放出来。注意,剪接是由两个转酯基作用完成的,而不是由水解作用和紧接着的连接作用完成的。第一个反应在外显子 1 的末端产生游离的 3'-OH,第二个反应把这一基团连到外显子 2 的 5'磷酸基团上。在这些步骤中磷酸双酯键的数目保持不变。在两个外显子连到一起之前,一直是由剪接体(spliceosome)把第一个反应的产物集中在一起的,剪接体是核糖核蛋白的组装机体,它识别 mRNA 前体的 5'剪接部位、3'剪接部位和分支部位。

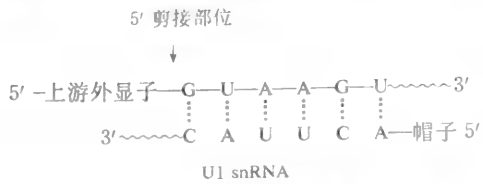
## 小的核中核糖核蛋白颗粒(snRNPs)与 mRNA 前体结合形成剪接体

细胞核和胞液中有许多类型的小的 RNA 分子,其大小少于 300 个核苷酸。它们被称之为 snRNA(小的核 RNA, small nuclear RNA)和 scRNA(小的细胞质 RNA, small cytoplasmic RNA)。这些 RNA 分子与特殊的蛋白质结合在一起形成名为 snRNPs(small nuclear ribonucleoprotein particles,小的核中核糖核蛋白颗粒)和 scRNPs(小的细胞质核糖核蛋白颗粒),研究工作者常把它们简称为“snurps”和“scurps”。剪接体是大的(60S)复合物,除含有 mRNA 前体外,还含有三种 snRNPs(表Ⅲ-29-4)。snRNPs 在剪接中的关键作用是这样阐明的:发现了加入对这些核糖核蛋白专一的抗体会阻断剪接过程。这种抗体是由患有全身红斑狼疮的病人得到的,这种病是自身免疫的,其特征是形成对抗细胞核中许多组分的抗体。关节和许多器官系统都受这种疾病的影响。

表Ⅲ-29-4 与 mRNA 前体的剪接有关的小的核中核糖核蛋白颗粒(snRNPs)

snRNP	snRNP 的大小 (核苷酸数目)	作用
U1	165	结合 5'剪接部位
U2	185	结合分支部位
U5	116	结合 3'剪接部位
U4—U6	145(U4) 106(U6)	组装剪接体

在哺乳动物细胞中,U1 snRNP 识别 5'剪接部位。事实上,U1 RNA 含有与这一剪接部位互补的顺序,而 U1 snRNP 结合在 mRNA 前体上则保护了一个 15 个核苷酸的区域使不被消化。



U2 snRNP 在一需要 ATP 的反应中与分支部位和多聚嘧啶区域相结合。U5 snRNP 识别 3'剪接部位。含有 U4 和 U6 snRNA 的颗粒也是剪接体的组装所必需的。酵母的剪接体含有一种 1.2 kb 的 RNA 分子,其顺序与哺乳类的 U2、U4、U5 和 U6snRNA 同源。这一种 RNA 分子所传递的剪接功能是哺乳动物系统中好几种 snRNA 所完成的。

### 自我剪接的 RNA：催化性 RNA 的发现

真核生物的核糖体 RNA 分子,和原核生物中的一样,是由原初转录本裂解而形成的。在四膜虫 (*Tetrahymena*, 一种有纤毛的原生动物) 中,然后由 6.4kb 的前体中除去一 414-核苷酸的内含子,以产生成熟的 26S rRNA 分子。塞克 (T. Cech) 及其同事关于这一剪接反应的研究引出了一些非常出人意料之外的发现。他们把细胞提取物加到前体 RNA 中,以确定剪接对蛋白质的需要。使人吃惊的是,他们发现对照中进行了剪接,而对照中仅有前体和核苷三磷酸,但显然没有蛋白质。是否可能有一种必需的蛋白质没有从前体 RNA 上被去掉? 利用重组 DNA 方法来制备相当于这种 6.4kb 的前体的 DNA (寄主细胞大肠杆菌没有这种 RNA 分子),以免除这种疑问。然后用提纯的、编码此前体的 DNA 在体外进行转录,以产生合成的 RNA 底物用于剪接反应。结果仍然相同:在核苷酸存在下, RNA 剪接其自身,准确地切去 414-核苷酸的内含子。这一惊人的实验表明, RNA 分子可能有高度专一的催化活性并剪接其自身。

原来在反应混合物中有核苷酸类,因为 ATP 或 GTP 被认为可能是作为能源而必需的。后来证明所需要的辅助因子是鸟核苷单位,其形式可以是鸟核苷, GMP、GDP 或 GTP。G (代表这些化合物中的任何一种) 的作用不是能源而是一种起攻击作用的基团,它会瞬时地掺入 RNA。G 与 RNA 结合,然后攻击 5'剪接部位,与内含子的 5'端形成磷酸二酯键。这一转酯基反应在上游的外显子上产生一 3'-OH 末端。3'剪接部位就会被上游外显子的新形成的 3'-OH 基团所攻击。这第二个转酯基反应把两个外显子连结起来了,并导致 414-核苷酸内含子的释放。

还要进行两轮的自我剪接。内含子的 3'-OH 攻击靠近 5'端的磷酸二酯键,形成一个环和一个 15 核苷酸的片段。此片段含有第一步中掺入的 G。这一 399 个核苷酸的环打开,成一线状分子,它再环化,丢掉一 4-核苷酸的片段。这个环打开后成一线状 RNA,名为 L-19 IVS (linear minus 19 intervening sequence,线状的减去 19 个插入顺序的),我们将称之为 L19 RNA。

自我剪接决定于 rRNA 前体的结构上的整体性。内含子中有许多是自我剪接所必需的。这种分子,也和许多种 RNA 分子一样,具有折叠的结构,是由许多双螺旋的干 (stem) 和环



(loop) 组成的。折叠的 RNA 除含有较强的 AU 和 GC 碱基对外, 还有较弱的 GU 碱基对; 它们的大致亲和力是 GU : AU : GC 为 1 : 100 : 1000。加入变性剂, 如二甲基甲酰胺破坏二级和三级结构时, 剪结就被阻断。其次, G 的结合是可饱和的 ( $K_M$  为  $32\mu\text{M}$ ), 并可被竞争性地抑制。这些发现有力地说明, 前体可能有一个对 G 的专一的起结合作用的口袋。

碱基顺序的分析说明 5' 剪接部位与起催化作用的残基可能是排成一行的, 这种排列是由碱基配对造成的, 即上游外显子的富于嘧啶的区域 (CUCUCU) 和内含子内富于嘌呤的指导顺序 (GGGAGG) 之间发生碱基配对。内含子使鸟核苷辅基与 5' 剪接部位碰到一起, 于是 G 的 3'-OH 就能对这一剪接部位上的磷原子进行亲核攻击。内含子的另一部分然后使下游外显子处于这样一个位置, 以便上游外显子上新形成的 3'-OH 能攻击它。在两个外显子间形成了磷酸二酯键, 而内含子则以线状分子的形式被释放。这种 rRNA 前体中键的形成和断裂的自我催化是高度地立体专一的, 像蛋白质性质的酶类所进行的催化作用一样。

然后富于嘌呤的指导顺序再与线状内含子的另一个富于嘧啶的顺序相结合, 形成一个环, 并释放一 15-核苷酸的片段。这个环再打开, 另一个富于嘧啶的顺序又与指导顺序相结合, 又产生一个少了 4 个核苷酸的新环。最后, 这个 395-核苷酸的内含子打开, 产生 L19 RNA, 它是稳定的, 因为再没有互补的富于嘧啶的顺序了。不过, L19 RNA 仍具有结合 G 的部位和指导顺序。塞克 (T. Cech) 的推论是, L19 RNA 可能对外界的底物起作用。实验上确是如此。如前所述 (第 9 章), L19 RNA 催化五胞核苷酸 ( $C_5$ ) 转变为较长和较短寡聚体的反应。因此, L19 RNA 是一种真正的酶: 它既是核酸酶, 又是聚合酶。 $C_5$  被这种 RNA 性质的酶 (核酸性酶, ribozyme) 水解的速率约为非催化速率的  $10^{10}$  倍, 证明 RNA 分子可能有很强的催化本领。这一发现说明, 在进化的早期 RNA 可能在没有蛋白质参与之下复制其自身。

## 剪接体所催化的剪接可能在进化上是 由自我剪接演变而来

酵母和真菌的线粒体中的 mRNA 前体也发生自我剪接, 和单细胞生物如衣藻 (Chlamydomonas) 的叶绿体中的某些 RNA 前体一样。可根据攻击上游剪接部位的单位的本质对自我剪接反应进行分类。第 I 类自我剪接反应是由鸟核苷因素为媒介的, 如四膜虫中的。第 II 类剪接中的起攻击作用的部分是内含子的一个专一的腺苷酸的 2'-OH。转移 RNA 的前体是由一种完全不同的机理所剪接的, 如前所述。

第 I 类和第 II 类自我剪接在两个方面与剪接体所催化的剪接类似。第一, 起始步骤是核糖的 3'-OH 攻击 5' 剪接部位。然后, 上游外显子的新形成的 3'-OH 末端攻击 3' 剪接部位, 与下游的外显子形成磷酸二酯键。第二, 两个反应都是转酯基反应, 在反应中每一个剪接部位上的磷酸部分都保留在产物中。磷酸二酯键的数目保持不变。第 II 类剪接还在另外两个方面与剪接体催化的 mRNA 前体的剪接相像。第一次酶切是由内含子本身的一部分 (A 的 2'-OH) 所进行的, 而不是由一外部因素 (G) 所进行的。其次, 内含子以套索形式被释放出来。

夏普 (P. Sharp) 曾提出, 剪接体所催化的 mRNA 前体的剪接是由 RNA 催化的自我剪接进化而来的。第 II 类剪接很可能是第 I 类剪接与高等真核生物的细胞核中所发生的剪接之间的中间类型。这种过渡中的主要步骤是催化能力从内含子本身转移到别的分子上。剪接体的

形成给了内含子新的自由度，因为不再强制它们提供剪接的催化中心。剪接的外部催化剂的另一个优点是可以更容易地调节它们。U1 snRNA 与 5' 剪接部位的互补说明剪接体的 RNA 组分参与识别剪接部位。RNA 非常适于与别的 RNA 分子相互作用，因为碱基配对是准确的。了解这一点将是非常有趣的，即剪接体的活性部位的催化基团是否来自于它们的 snRNA 或蛋白质组分。剪接体、核糖体和其他核糖核蛋白复合物中的 RNA 都可能有催化活性。我们的眼界已经打开，将会对早期 RNA 世界和当代生命之间的连续性有越来越多的了解。

## 第 30 章 蛋白质的合成

### 蛋白质合成的准确性依赖于氨酰 tRNA 合成酶的高度专一性

(上略) 大多数氨酰 tRNA 合成酶含有合成部位和水解部位。两个部位的互补碱基对起着**双重筛子**的作用, 以保证高度的准确性。合成部位抛弃那些比正确的氨基酸大的氨基酸, 因为空间不够大, 放不下它们; 而水解部位则水解那些比正常的小的活化的中间产物。水解性的校对是保证许多种氨酰-tRNA 合成酶准确的核心所在, 正如对 DNA 聚合酶一样。不过, 有少数合成酶不是靠校对其共价连结的中间产物而达到高度准确性的。例如, 酪氨酰-tRNA 合成酶在区分酪氨酸和笨丙氨酸方面没有困难; 酪氨酸环上的羟基使得它结合在酶上要比笨丙氨酸强  $10^4$  倍。校对需要能量和时间, 因此在进化过程中只有在最初结合的相互作用不能保证准确性时才选用它。

### 过渡状态中 $\gamma$ -磷酸基的结合大大促进了酪氨酰-AMP 的形成

X 射线结晶学和蛋白质工程的研究对酪氨酰-tRNA 合成酶的作用提供了深入的认识, 这种合成酶是 47kd 亚基的二聚体。氨基端的 320 个残基是活化反应所必需的, 而羧基端的 99 个残基则参与 tRNA 的结合和酪氨酰-tRNA 的形成。含有结合着的 tRNA-AMP 的合成酶的晶体结构已用高分辨率解决了。这种中间产物在与之配合的 tRNA 不存时也是稳定的, 而且是通过约 12 个氢键与酶结合的。

由酪氨酸和 ATP 形成酪氨酰-AMP 引起  $\alpha$ -磷原子构型的**转化** (inversion)。因此, 反应大概以**成列取代** (in-line displacement) 的方式进行, 即酪氨酸的羧基根为起亲核攻击作用的, 焦磷酸根则为离去的基团。过渡状态中的  $\alpha$ -磷原子是五共价的, 成底贴底的双锥形体的几何形状, 像核糖核酸酶所催化的水解反应中的一样。

根据这些证据, 用建立模型法 (model building) 提出了一个过渡状态的可能的结构。这一模型的关键性特征是  $\gamma$ -磷酸基团与苏氨酸 40 和组氨酸 45 两个侧链之间的氢键。这些残基是由于有选择地使过渡状态稳定化而促进了催化作用吗? 曾用定位突变的办法来研究它们的重要性, 即把组氨酸 45 改变成甘氨酸, 把苏氨酸 40 改变为丙氨酸, 以消除形成氢键的可能性。

这些工程出来的突变的蛋白质非常说明问题 (表 III-30-2)。双突变体的催化活性仅为天然蛋白的  $3 \times 10^{-6}$  倍, 但与 ATP 及酪氨酸结合的亲和力却变化很少。这一实验表明苏氨酸 40 和组氨酸 45 是催化作用所必需的, 而不是结合底物所必需的。显然, 它们与过渡状态中的  $\gamma$ -磷酸基团发生强的相互作用, 但不与起始的酶-底物复合物中的同样基团发生相互作用。从四

面体的几何形状变到双锥体的几何形状的同时，焦磷酸单位的位置发生了很大的改变，正是这种改变引发了这种有选择的结合。回忆一下，催化作用的实质就是有选择地使过渡状态稳定（第8章）。

表 III-30-2 突变的酪氨酰-tRNA 合成酶的性质

酶	关键性残基		$k_{cat}(s^{-1})$	解离常数 ( $\mu M$ )	
				酪氨酸	ATP
天然的	苏 40	组 45	38	12	4700
突变的	苏 40	甘 45	0.16	10	1200
突变的	丙 40	组 45	0.0055	8	3800
双突变的	丙 40	甘 45	0.00012	4.5	1100

据 R. J. Leatherbarrow, A. R. Fersht and G. Winter. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 (1985): 7842.

酶中的哪一个基团直接参与键的形成和断裂？大概没有。酪氨酸的羧基本质上是有效的亲核基团，ATP 已被活化， $Mg^{2+}$ -焦磷酸是一好的离去的基团。酶只要把酪氨酸和 ATP 带到一起，就可加速催化作用约  $4 \times 10^4$  倍，而主要由于结合过渡状态中的  $\gamma$ -磷酸基团，又可加速  $3 \times 10^5$  倍。值得注意的是过渡状态中新的相互作用与作用中心即  $\alpha$ -磷原子之间有些距离。因此，催化作用可能是非定域化的 (delocalized) ——这解释了对过渡状态的选择性结合，不管它是怎样完成的。

多个转移 RNA 分子来自于核糖核酸酶 P 对大的前体的酶切

大肠杆菌中转移 RNA 分子的 60 个基因是集中在 25 个单位中的，这些单位被转录成多种多样的前体。有些单位还编码核糖体 RNA 类，而其他的则仅有 tRNA 类。这些转录本中有一种是 7 种 tRNA 的前体：这 7 种中，一种是对亮氨酸专一的；2 种是对内部的甲硫氨酸专一的；还有 4 种，每 2 种是对两种谷酰胺密码子中的一种专一的。950 个核苷酸的原初转录本被核糖核酸酶 P (RNA 酶 P) 切开，切点在将来的每一成熟 RNA 的第一个核苷酸的 5' 侧。然后核糖核酸酶 D (RNA 酶 D) 从暴露的 3' 端修剪每一个切段，直到达到 CCA 顺序为止。CCA 就是成熟分子的 3' 末端。

核糖核酸酶 P 是一种核糖核蛋白酶，由 377 个核苷酸的 M1 RNA 分子和 20kd 的蛋白质组成。阿尔特曼 (S. Altman) 发现此 RNA 组分单独地就有酶活性。在 60mM  $Mg^{2+}$  (比生理浓度高得多) 中，M1 RNA 本身就能识别原初转录本中的靶子部位，并以可观的速率将其切开。这一实验证明 M1 RNA 专一地与底物相互作用，并具有催化基团。蛋白质的作用是次要的——它增加水解速率，并使得反应能在低得多的  $Mg^{2+}$  浓度下进行。我们在这里又看到另一个具有催化活性的 RNA 的例子。

核糖体是核糖核蛋白颗粒 (70S)，由大 (50S)、小 (30S) 两种亚基组成

到此为止，我们已经研究了使氨基酸活化并将其连到转移 RNA 上的合成酶，转移 RNA 是生物体系中两套基本字母之间的连接器。现在我们来研究核糖体，它是在蛋白质合成的复杂过程中把各种 tRNA、mRNA 和蛋白质的相互作用协调起来的分子机器。大肠杆菌的核糖体是核糖核蛋白颗粒，其质量为 2700 左右 kd，直径约 200 Å，沉降系数 70S。它可解离成一个大亚基 (50S) 和一个小亚基 (30S)。这些亚基又可进一步被分成它们的组分蛋白和 RNA。30S 亚基含有 21 种不同的蛋白质 (标号为 S1 至 S21) 和一种 16S 的 RNA 分子。50S 亚基含有 34 种不同的蛋白质 (标号 L1 至 L34) 和 2 种 RNA 分子，23S 的和 5S 的。一个核糖体含有每种 RNA 分子各 1 个拷贝，2 个 L7 和 2 个 L12，其余各种蛋白质每种 1 个。一个细菌细胞中的二万个核糖体约组成其质量的四分之一。

### 各种核糖体 RNA (5S, 16S 和 23S rRNA) 含有许多碱基配对的螺旋区域

**核糖体 (ribosome)** 这个名词的字头“核”(ribo)是很恰当的，因为在这些大的分子组装体中，RNA 占了其质量的将近三分之二。对于核糖体的结构和功能，三种 RNA——5S, 16S 和 23S——是关键性的。这些 rRNA 的显著特点就是它们折叠成一种固定的结构，有许多短的双链区。由于进行了化学修饰和消化实验和比较了许多种的核苷酸顺序以检测其保守的特点，已经推导出了这些分子的碱基配对情况(图 III-30-18)。30S 核糖体亚基的一个组分，即 16S

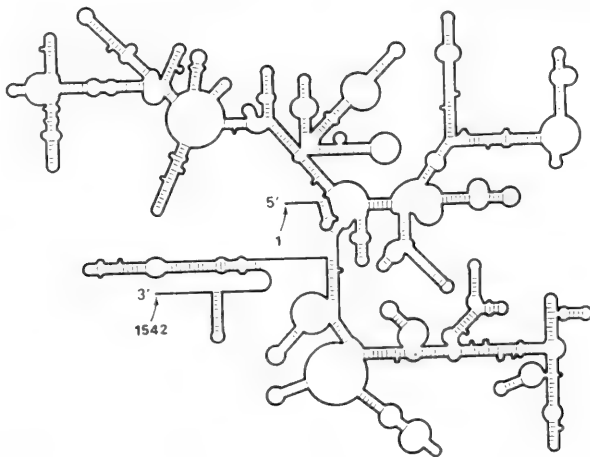


图 III-30-18 核糖体 RNA 分子的折叠情况。

RNA 的 3' 端，在选择 mRNA 模板上的起始部位方面起着关键作用，下文即将谈到。现在的一个挑战是阐明 rRNA 的其它作用。

核糖体 RNA 分子是由原初的 30S 转录本经酶切而形成的，此转录本含有并列成组的

16S、23S 和 5S 单位。这些大的前体是由 7 个不同的 rrr 操纵子编码的。在每一个转录本中，一个或两个 tRNA 在 16S 和 23S RNA 之间，还有多达两个 tRNA 在 5S RNA 之后。核糖核酸酶 III (RNA 酶 III) 将前体 RNA 酶切为前-16S 和前-23S 片段。当核糖体蛋白质与这些片段结合后，再发生进一步的加工。

## 正在用电镜术、中子衍射和交联法作出核糖体构造的图谱

阐明核糖体的结构和功能的关系是令人生畏的挑战，因为核糖体太大了（数兆道尔顿）。尚未得到核糖体的高度有序的三维结构的晶体。尽管如此，研究工作者正在描绘核糖体的总体形状、它的表面的拓扑学和它的蛋白质及核酸组分的定位。这一给人深刻印象的进展是许多实验室应用各种各样技术的结果。核糖体及其 30S 和 50S 亚基的形状是由许多张电镜照片重建出来的。利用对特定蛋白质专一的抗体进行的免疫电镜术揭示了许多表面特征的同源性。与 mRNA 结合的部位和 16S 的 3' 端位于一平台上，此平台在 30S 亚基的上、下两部分之间。这一平台与此亚基上面的三分之一部分之间的裂缝是 2 个 tRNA 的结合部位。50S 亚基有 3 个突起的部分。催化肽键形成的肽键转移酶部位位于两个突起之间的谷中；一个手指状的突起含有 GTP 酶部位，这是给 tRNA 和 mRNA 的移动供应能量的。生长中的多肽链的出口部位在 50S 亚基的相对一侧上。

用中子衍射法分析浓溶液，已测定了 30S 亚基的 21 种蛋白质的定位。用中子而不用 X 射线，因为氘和氢的中子衍射是非常不同的。实验的策略是用两种含氘的它的蛋白质重组 30S 亚基，含氘的蛋白质是在  $D_2O$  中培养细菌而得到的。然后中子的衍射即揭示核糖体颗粒中两种含氘的蛋白质的质量的中心之间的距离。含有不同的一对含氘蛋白质的这种亚基的许多次的测定导致了关于这些蛋白质的位置的图谱。化学交联的研究支持了这一图谱，这些研究证明一对对的亚基（例如 S5 和 S8）相距不到  $10\text{\AA}$ ，可由短的双功能的试剂从中连接起来。

## EF-Tu 的 GTP 酶速率确定蛋白质合成的步伐， 并决定其准确性

蛋白质合成的准确性依赖于当肽键形成时 A 部位中有正确的氨酰-tRNA。这是无法挽回的，因为一旦肽键造成了，细胞便无法将错误的氨基酸残基切去。如所预料，进来的氨酰-tRNA 是受到仔细的、一丝不苟的审查的，以保证其反密码子与占据着 A 部位的 mRNA 密码子是互补的。能与密码子中三个碱基中的两个配对的氨酰-tRNA 可以瞬时结合上，但通常它会在肽键形成之前就离开 A 部位。核糖体需要时间来确定结合的氨酰-tRNA 是否就是正确的。假若在一个氨酰-tRNA 到达时立即形成肽键，那么蛋白质合成就可能不准确。决定着详细审查所需时间的计时器就是 EF-Tu 的 GTP 酶（图 III-30-33）。在 EF-Tu 从氨酰基 tRNA 上被释放出来之前，肽键不能形成；释放要求结合的 GTP 被水解为 GDP。平均说来，GTP 水解之前，数毫秒已过去了；而在 EF-Tu-GDP 离开核糖体之前，又有几毫秒过去了。错误的氨酰-tRNA 通常在此间隔之一的时间内，就离开了核糖体，而正确的氨酰-tRNA 则仍是结合的。当 EF-Tu 水解 GTP 时，其构象发生改变，所以密码子-反密码子的相互作用的前后关系也改变了。正确的氨酰-tRNA 与两种状态的 mRNA 均有强相互作用，而错误的则否。事实上，以两种方

式审查了密码子-反密码子的相互作用两次，这就保证高度的准确性。正像 2 个人各校对手稿 1 小时要比 1 个人校对 2 个小时的效果好得多一样。这种保证正确的氨基酸被连到 tRNA 上的双校对的机理再一次表明，多次的考察在检查真实性方面多么重要。

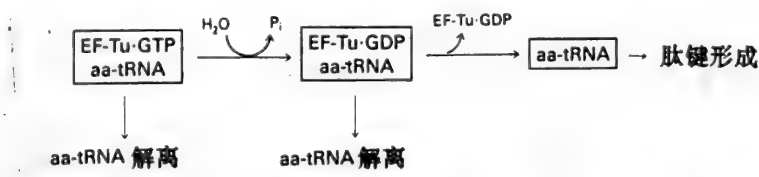


图 Ⅲ-30-33 对占据核糖体 A 部位的氨酰-tRNA 的校对进行两次，即结合在 EF-Tu 上的 GTP 水解前和水解后各一次。错误的氨酰-tRNA 从 A 部位上解离，而正确的氨酰-tRNA 则仍结合在其上，而且会形成肽键。

氨酰-tRNA 的选择应该精确到什么程度？形成没有错误的蛋白质的几率决定于  $n$  和  $e$ ， $n$  是氨基酸残基的数目， $e$  是插入错误氨基酸的频率：

$$P = (1 - e)^n$$

如表 Ⅲ-30-4 所示，即使对于十分小的蛋白质， $10^{-2}$  的错误频率就是不能容忍的。 $e$  为  $10^{-3}$ ，通常会导致 300 个残基的蛋白质（ $\sim 33\text{kd}$ ）的无错误的合成；但对 1000 个残基的蛋白质（ $\sim 110\text{kd}$ ），则否。因此，要有效地产生较大的蛋白质，每个残基的错误频率应不多于每个残基的  $10^{-4}$ 。事实上，所观察到的  $e$  接近于  $10^{-4}$ 。值得注意的是，在体外利用 GTP  $\gamma$ S 可达到更高的准确度，GTP  $\gamma$ S 是 GTP 的类似物，它被 EF-Tu 水解的速率比 GTP 的慢上千倍。在核糖体上停留的时间较长会促进其准确度，因为有更长的时间让错误的氨酰-tRNA 离去。不过，用这种方法得到的较高的准确度在动力学上代价高，而所合成的功能性蛋白质的数目并不多。另一方面， $e$  为  $10^{-2}$  的蛋白质合成快，但几乎所有的产物都是错误的。在进化过程中选择了每个氨基酸残基约  $10^{-4}$  的错误频率可以在最短的时间内产生数目最多的功能性蛋白质。

表 Ⅲ-30-4 蛋白质合成的准确性

插入错误氨基酸的频率	合成无错误的蛋白质的几率		
	氨基酸残基的数目		
	100	300	1000
$10^{-2}$	0.364	0.049	0.000
$10^{-3}$	0.915	0.840	0.368
$10^{-4}$	0.990	0.970	0.905
$10^{-5}$	0.999	0.997	0.990

## 真核的和原核的蛋白质合成有许多共同的结构和机理上的特点

真核生物中蛋白质合成的基本计划和原核生物中的类似。主要的结构上的和机理上的要点在高等生物中重复出现。不过，与真核生物的蛋白质合成有关的蛋白质组分较多，有些步骤更为复杂。兹将某些相同点和不同点列举如下：

1. **核糖体**。真核生物的核糖体较大。它们由 60S 大亚基和 40S 小亚基组成，这两种亚基合在一起形成 80S 颗粒，其质量为 4200kd，而原核生物的 70S 核糖体为 2700kd。40S 亚基含有 18S RNA，与原核的 16S RNA 同源。60S 亚基含有三种 RNA：5S 和 28S RNA 是原核的 5S 和 23S 的分子的伙伴；其 5.8S RNA 则为真核生物所特有。

2. **起始物 tRNA**。在真核生物中，起始的氨基酸是蛋氨酸而不是 N-甲酰蛋氨酸。不过，也像在原核生物中一样，一种特殊的 tRNA 参与起始作用。这种氨酰-tRNA 名为 Met-tRNA<sub>i</sub> 或 Met-tRNA<sub>i</sub> (f 表示可在体外被甲酰化，i 表示起始)。

3. **开始信号**。真核生物中起始密码子总是 AUG。与原核生物不同，真核生物不利用 5' 侧富含嘌呤的顺序将起始物的 AUG 与内部的 AUG 区别开。而是把 mRNA 上最靠近 5' 端的 AUG 选作起始部位。40S 核糖体连在真核 mRNA 5' 端的帽子上，并沿着 3' 的方向一步一步移动，以寻找 AUG 密码子。这一筛选过程是由 ATP 的水解推动的。结合在 40S 亚基上的 Met-tRNA<sub>i</sub> 的反密码子与 AUG 密码子配对，这表示已经找到靶子了。真核的 mRNA 只有一个起始部位，因此是合成一种蛋白质的模板。与之相反，原核的 mRNA 可能有多个起始部位，因而是合成数种蛋白质的模板。

4. **起始复合物**。真核生物含有的起始因子比原核生物的多得多，它们之间的相互作用也复杂得多。已知有 9 种，有几种又由多个亚基组成。eIF 字头表示真核的起始因子。eIF2 (1000kd) 的 GTP 形式把起始物 tRNA 带到 40S 亚基上。与帽子结合的蛋白质 (CBPs, cap-binding proteins) 结合在 mRNA 的帽子上。它们又由 eIF3 连接起来，eIF3 则寻找离 5' 端最近的 AUG。在此找寻过程中 eIF4 是 ATP 推动的机器。在 Met-tRNA<sub>i</sub> 与起始信号 AUG 配对之后，eIF5 诱导 eIF2 和 eIF3 的释放；eIF5 引发结合在 eIF2 上的 GTP 的水解而发动这些反应。最后，60S 亚基与起始物 tRNA 复合物、mRNA 和 40S 亚基结合在一起，形成 80S 的起始复合物。

5. **延长和终止因子**。真核的延长因子 EF1  $\alpha$  和 EF1  $\beta\gamma$  是原核的 EF-Tu 和 EF-Ts 的伙伴。EF1  $\alpha$  的 GTP 形式把氨酰-tRNA 传到核糖体的 A 部位上，EF1  $\beta\gamma$  则催化 GTP 与结合的 GDP 的相互交换。真核的 EF2 传达 GTP 推动的移位，其方式与原核的 EF-G 的非常相似。真核生物中的终止作用是由单一的释放因子 eRF 进行的，这是由 GTP 推动的蛋白质；在真核生物中，这是由两个因子进行的。最后，eIF3 和它的原核的同伴一样，防止在起始复合物不存在时核糖体亚基的再结合。



## 真核生物中的翻译是由蛋白质激酶调节的， 它钝化起始因子

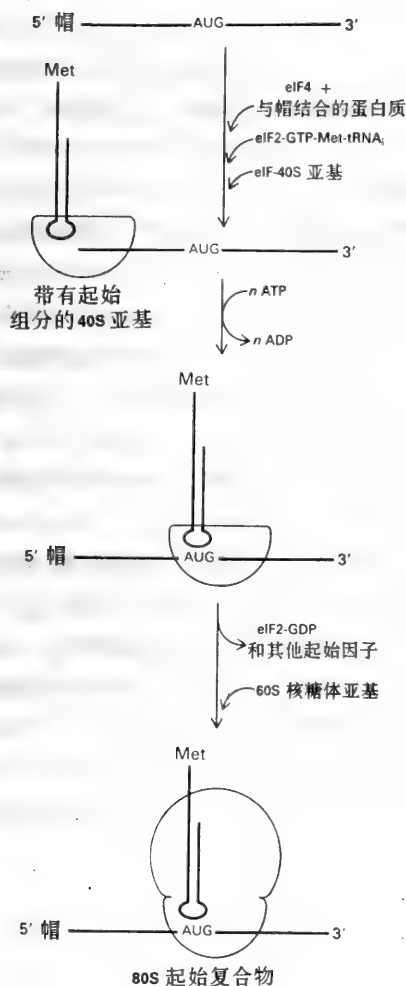


图 30-38 含有起始物 tRNA 和数种起始因子的 40S 核糖体亚基从 5' 帽子处开始筛选 mRNA。当发现第一个 AUG 密码子时起始因子解离。然后 60S 亚基与 40S 亚基结合形成 80S 起始复合物，此复合物已为延长作好了准备。

的合成，此种蛋白极易变性。很可能的是，由各种激酶催化的 eIF2 的磷酸化作用也被其他细胞用来控制翻译。在被病毒感染的细胞中发现了一种由于干扰素诱导的激酶也起类似作用（第 34 章），这说明这种机理可能被广泛用于控制真核细胞中的基因表达。

网织红细胞的提取物在血红素的供应枯竭之前，以很高的速率合成血红蛋白亚基。没有血红素时，蛋白质合成停止，因为突然形成了一种蛋白质合成的抑制剂，称为由血红素控制的抑制剂 (HCl, heme-controlled inhibitor)。HCl 的作用机理在发现它是一种激酶之前一直是个谜，此激酶磷酸化 eIF2 的  $\alpha$  亚基，eIF2 是把 Met-tRNA<sub>i</sub> 带到 40S 核糖体亚基上的起始因子（图 30-38）。磷酸化以下列方式阻断 eIF2 的再循环。当 eIF2 从 40S 亚基上被释放出来而形成 80S 的起始复合物时，eIF2 呈 GDP 形式。在它转变成 GTP 形式之前，eIF2 不能结合 Met-tRNA<sub>i</sub>，以起始另一轮蛋白质合成。所需要的把 GTP 转变为结合在 eIF2 上的 GDP 的过程是由称为 GEF (guanyl nucleotide exchange factor, 鸟核苷酸交换因子) 或 eIF2B 催化的。但是如果 eIF2 被血红素所控制的激酶磷酸化，它对 GEF 的亲合力就会非常之高，以至于复合物的形成实质上是不可逆的。因此，磷酸化的 eIF2 分子不能使蛋白质合成开始。而且，它们把 GEF 束缚起来，而 GEF 本来就比 eIF2 少。结果只要有 30% eIF2 被磷酸化，就会使蛋白质合成完全停止。当磷酸化的 eIF2 上的磷酸根被专一的磷酸酶除去之后，它又会恢复其功能。

网织红细胞中 eIF2 的磷酸化的生理作用是协调血红素和珠蛋白的合成。当血红素的水平低时，珠蛋白的合成停止，以防止脱血红素的血红蛋白 (apohemoglobin)

## 白喉毒素由于抑制移位而阻断真核细胞中的蛋白质合成

在发明有效的免疫方法之前，白喉是儿童死亡的主要原因。这种疾病之所以致死，主要是由于生长在上呼吸道中的白喉菌（*Corynebacterium diphtheriae*）产生一种蛋白质毒素。编码这种毒素的基因来自于一种溶原噬菌体，某些品系的白喉菌中容有这种噬菌体。对于未免疫的人，几毫克白喉毒素通常就足以致死，因为它抑制蛋白质的合成。它是由单个的 61kd 的链组成的，其中有两个二硫键。这是一种有两个部分的蛋白质。A 结构域催化蛋白质合成机构中一个关键性组分的共价修饰，而 B 结构域则使 A 结构域横穿过质膜并进入胞液中。B 结构域结合到细胞表面上的一个专一的受体（尚未鉴定出来）上，于是引发了毒素之分为一个 21kd 的 A 片段和一个 40kd 的 B 片段、它们之间的二硫键的还原以及 A 片段之转移到胞液中。

胞液中毒素的单独的 A 片段就能杀死细胞。为什么它的毒性如此之大？A 片段的酶促活性的靶子地 EF<sub>2</sub>，即真核细胞蛋白质合成中催化移位的延长因子。EF<sub>2</sub> 含有白喉酰胺，一种功能未知的不寻常的氨基酸残基，是由组氨酸的翻译后修饰而形成的。毒素的 A 片段催化 NAD<sup>+</sup> 的腺二磷核糖单位转移到白喉酰胺环的一个氮原子上（图 III-30-40）。EF<sub>2</sub> 的一个侧链的这种 ADP-核糖基化就会阻断它使生长中的肽链移位的能力。蛋白质合成停止了，这就解释了白喉毒素的极为明显的毒性。注意到下列一点是有趣的，即各种各样的别的毒素，例如霍乱毒素和百日咳毒素也是一个与细胞表面的受体结合的结构域和一个起催化作用的结构域，后者不可逆地修饰一个重要的细胞组分。

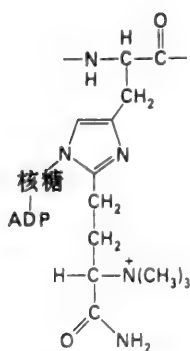


图 III-30-40 白喉毒素阻断真核细胞中的蛋白质合成，因为它催化 NAD<sup>+</sup> 上的 ADP-核糖单位转移到白喉酰胺（diphthamide）上，白喉酰胺是延长因子 2（移位酶）上一个修饰过的氨基酸残基。

## 第 31 章 蛋白质的到位

新生的蛋白质含有决定着其最终去向的信号。例如，大肠杆菌中新合成的蛋白质可能停留在胞液中，也可能被送到质膜、外膜，这两种膜之间的空间或细胞外的介质中去。真核细胞可以指令蛋白质到细胞内的各种部位去，如溶酶体、线粒体、叶绿体和细胞核。这种分拣是怎样完成的呢？在真核生物中，蛋白质的合成开始之后不久就作出了关键性的选择。核糖体以游离状态停留在胞液中，除非它被所合成的蛋白质中的信号顺序指令它到内质网（ER）去。由这种结合在膜上的核糖体合成的新生蛋白质链会被转运，通过 ER 膜。在 ER 空腔中的许多蛋白质链被糖基化，或以别的方式被修饰。然后它们被运至高尔基体中，并在其中进一步被修饰。最后，它们被分拣，以便被送到溶酶体、分泌性囊泡和质膜中去。用来使真核生物中的蛋白质通过内质网膜而被转运的信号是古老的——细菌也用类似的顺序以将蛋白质送至质膜上，或将其分泌。真核细胞中用来把游离的核糖体所合成的蛋白质送至细胞核、线粒体和叶绿体中的办法则又不同。

与蛋白质的到位互补的方面是通过以受体为媒介的胞吞作用（receptor-mediated endocytosis）将蛋白质运进真核细胞。胞外空间的蛋白质与专一的受体相结合，受体在质膜中名为有壳小孔（coated pit）的特定部位上。笼形蛋白（clathrin），一种形成多面体晶格的蛋白质，把有壳小孔的区域转变为细胞内与膜结合的囊泡。当这些囊泡被酸化时，输入的蛋白质便从受体上解离下来。许多病毒和毒素之所以进入细胞，就是因为它们很像那些通常被胞吞作用运入细胞的分子。

本章的最后一节讨论编好程序的蛋白质的破坏。蛋白质的半衰期受到其氨基末端残基的影响很大。存在于所有真核细胞中的泛素（ubiquitin）会与作了降解记号的蛋白质结合起来。

### 胞液中的蛋白质能由于一种信号顺序结合在其氨基末端上而被指令到 ER 去

由重组 DNA 技术所形成的嵌合蛋白质使我们对于蛋白质到位的机理有了深入的认识。这种研究方法曾用来确定可切开的末端氨基信号顺序是否包括了指令蛋白质穿过膜的全部信息。这种实验中的信号顺序来自  $\beta$ -内酰胺酶（ $\beta$ -lactamase），这是大肠杆菌中一种水解青霉素和其它  $\beta$ -内酰胺的酶。当它被合成以后，这种酶被分泌到细菌的外膜和质膜之间的浆膜外周间隙（periplasmic space）中。在这一过程中，有一个 23 个残基的信号顺序从多肽上被切下来。这个顺序和  $\beta$ -内酰胺酶中与此顺序相连的 5 个残基都连在血红蛋白的  $\alpha$ -链的氨基末端上，这是由形成一杂交的基因而做到的。选择  $\alpha$ -珠蛋白作为供试蛋白，是因为它通常是留在胞液中的，而且也是高度亲水的。

将这种嵌合蛋白的 mRNA 加到一体外合成蛋白质的系统中。此系统能将分泌的蛋白质运过 ER，它是由微粒体、核糖体、tRNA 和蛋白质合成和转运所需要的其它因子组成的（微粒体是由内质网膜碎片自我封闭而成的闭合的囊泡）。带有信号顺序的合成  $\alpha$ -珠蛋白的核糖体

会结合到微粒体上。最为惊人的是，新生的多肽链穿过了 ER 膜，信号顺序被切下来，而  $\alpha$ -珠蛋白则被分泌到囊泡之内。这样，向  $\alpha$ -珠蛋白加入一信号顺序就把它从泡液中的蛋白质转变为分泌的蛋白质了。这一实验还证明，细菌的和真核生物的信号顺序在功能上是类似的。

信号识别颗粒 (SRP) 探查信号顺序，并把核糖体带到 ER 膜上

信号顺序是如何被识别的？含有这种顺序的蛋白质又是怎样被运过 ER 膜的？瓦尔特 (Blobel 和 Peter Walter) 证明，把胞液中的合成蛋白质的机构和 ER 膜中转运蛋白质的机构连接起来的器具是一种核糖核蛋白，名为信号识别颗粒 (SRP, signal recognition particle)。这种 325kd 的组装体是由一种 300 个核苷酸的 RNA 分子 (名为 7SL RNA) 和 6 种不同的多肽链组成的。SRP 与那些含有新生的、带有信号顺序的肽链的核糖体牢固地结合，但不与其它核糖体结合 (图 III-31-5)。在氨基末端的信号顺序从核糖体中伸出后不久，这种结合就发生了。当 SRP 被结合时，多肽链的延长就停止了或放慢了。然后 SRP-核糖体复合物就向 ER 膜扩散，SRP 在膜上与 SRP 受体结合，此受体是  $\alpha$  (69kd) 和  $\beta$  (30kd) 亚基的二聚体。含有新生的多肽链的核糖体被传递到转运机构，此机构包括两种膜内蛋白 ribophorin I 和 II。此时 SRP 就被释放到胞液中。新生的链于是恢复其延长。所以，SRP 起的是催化作用，把带有信号顺序的核糖体传递到 ER 膜上。

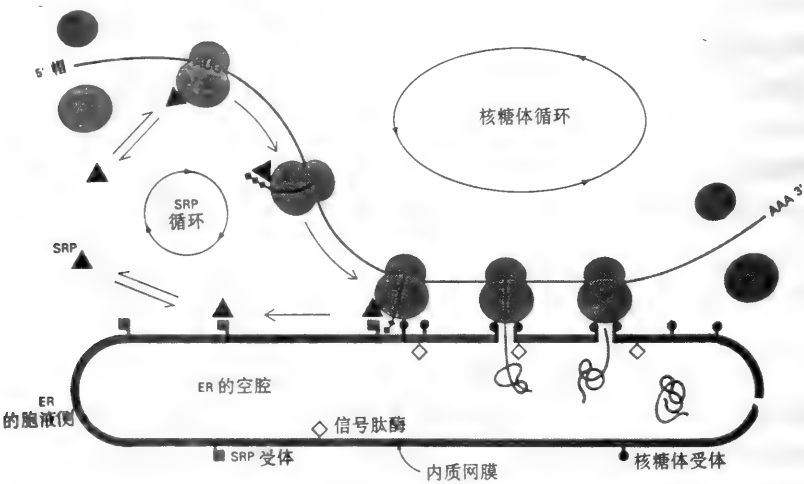


图 III-31-5 信号识别颗粒 (SRP) 参与核糖体到 ER 的传递。

SRP 识别新生多肽链的信号顺序。由 SRP、新生的链以及合成它的核糖体组成的复合物然后结合到 ER 膜中的 SRP 受体上。然后核糖体被转移到 ribophorin 和转运机关上，这种机关主动地将多肽链以线状穿过 ER 膜。从受体上释放出来的 SRP 又能与另一信号顺序结合。[据 P. Walter, R. Gilmore and G. Blobel. *Cell* 38 (1984) : 6]

SRP 杆状，长约 240 Å，粗约 50 Å。SRP 的结构主链是其 RNA 组分，此组分含有两个称为 Alu 的顺序，Alu 在哺乳动物的 DNA 中经常重复出现。这种 RNA 与 6 种蛋白质 (9, 14, 19,

54,68 和 72kd) 结合, 形成一个由两部分组成的 SRP。这种非常长的颗粒的一个结构域识别正在伸出的信号顺序, 并与之结合; 亲和力标记研究证明 SRP 的 54kd 亚基与信号顺序接触。SRP 的另一结构域则从空间上干扰氨酰-tRNA 的进入以及肽酰转移酶的步骤, 因此肽链的延长就被抑制。当 SRP 与 ER 膜上它的受体结合时, 这种抑制就解除了。SRP 受体的  $\alpha$ -亚基的胞液部分含有几个带有许多正电荷的环, 这些环大概与 SRP 的带负电荷的 RNA 相互作用。

## 转运是由 ATP 推动, 并由信号顺序和终止转移的顺序指导的过程

与膜结合的核糖体的拓扑学已在低分辨率下被阐明, 所用方法为免疫电镜技术和结晶簇的图象重建研究。新生的多肽链是从核糖体上的一个出口处伸出来的, 此出口部位距肽酰转移酶的部位约 150 Å。最新合成的 40 个残基位于一狭窄的、穿过核糖体大亚基的隧道中。出口部位则位于大亚基的表面上, 此表面与 ER 膜相接触。

肽链的延长和它穿过 ER 膜的运输之间是什么关系呢? 起初认为延长推动转运, 即肽链的合成把新生的链推进了双分子层中的蛋白质隧道内。可是, 最近的研究证明, 某些蛋白质, 如酵母菌交配因子的 18kd 的前体, 在已被完全合成并离开核糖体之后, 仍可被转运。事实上, 人红血球的葡萄糖转运体, 一种有 12 个跨膜  $\alpha$ -螺旋的大蛋白质, 在完全被合成后仍可在体外被缓慢地转运。这些翻译后的转运要求 ATP 的水解和一些与膜结合的以及溶解的蛋白质的参与。这样, **转运和延长是机械地分开的两个过程。**

那么为什么它们又常常同时发生呢? 答案是大多数具有信号顺序的完全合成的蛋白质不能有效地被转运, 大概是因为它们折叠起来了。例如, 一对相互作用的  $\alpha$ -螺旋大概就不能适合于核糖体中的隧道。**未折叠的多肽链是被运过 ER 膜的最合适的底物。**SRP 结合在核糖体上所引起的延长的抑制或放慢防止了在膜的胞液侧蛋白质链的过早折叠。核糖体也参与保持新生链的可运转性, 核糖体使最新合成的肽链部分在其狭窄隧道中保持于完全拉直的状态。目前的迫切问题是阐明膜机器中抓住新生的多肽链、并拉着它穿过 ER 膜的组分和机理。ATP 所推动的、沿着 DNA 和 RNA 不断向前的酶的运动可能类似于结合在膜上的运动肌肉所推动的多肽链的单方向运动。

膜本体蛋白的转运过程比分泌的蛋白和溶酶体蛋白的转运过程要复杂得多, 后两种蛋白是呈线状整个地穿过去的。有些膜本体蛋白只有一个跨膜螺旋, 但有的有好几个跨膜螺旋。其次, 氨基末端和羧基末端都可能在膜的两个侧面上, 因具体的蛋白质而异。这些不同的拓扑学是怎样产生的呢? 转运机器就像“巫师的徒弟”(Sorcerer's Apprentice) 一样, 其动作是不停止的, 除非接到专门的指令才停止, 在这种情况下, 这种指令就是新生的多肽上的**终止转移顺序**(stop-transfer sequence, 亦称在膜中下锚的顺序)。第二个信号顺序的出现又将使另一轮转运开始。转运机器也应该能将多肽链以相反的方向穿过膜。关于膜蛋白的组装和安置, 还有许多问题有待研究, 这是一个极有吸引力的领域。

## 转移囊泡将蛋白质从 ER 带到高尔基体中， 以便糖基化和分拣

ER 空腔中和 ER 膜中的蛋白质被转运至高尔基体内，这是一叠扁平的由膜组成的囊（前图 29-47）。高尔基体有两个主要的作用。第一，糖蛋白中的糖单位在高尔基体中被改造。O-连系的糖在此被加工，N-连系的则以许多不同方式被修饰。第二，高尔基体是细胞中主要的分拣中心。它根据蛋白质的三维结构中所编码的信号，将它们分送至溶酶体中、分泌性颗粒中或质膜中。

典型的哺乳类细胞的高尔基体大约有 6 个由膜组成的囊（槽库，cisternae），而大多数植物细胞的高尔基体则有大约 20 个槽库。槽库的堆叠是不对称的。高尔基体分化为：（1）顺（cis）区域，它距 ER 最近；（2）中间的（medial）区域；（3）反（trans）区域，此区域（槽库）将蛋白质送往不同的位置。这些不同的区域含有不同的酶，执行不同的功能。由转移囊泡（transfer vesicles）将蛋白质从 ER 转运至高尔基体的顺面，此囊泡的直径约 500 Å。这些囊泡的脂类双分子层是由一种形如猪鬃的外壳包围着的，这种外壳与胞吞囊泡（本章后面）的笼形（clathrin）外壳不同。从 ER 上长出囊泡的“芽”来，随后这些“芽”与顺高尔基体融合（图 III-31-12）。

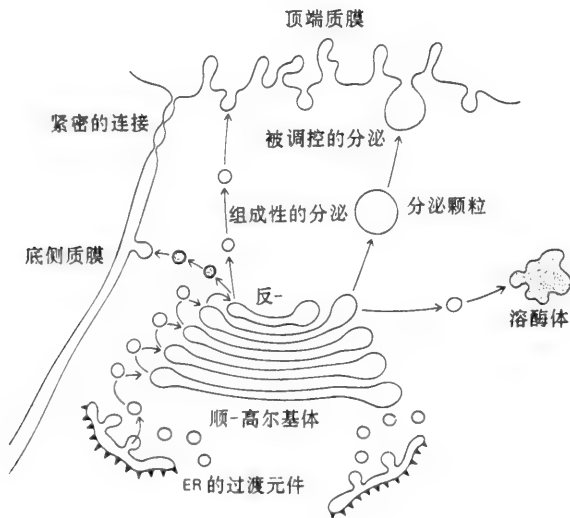


图 III-31-12 高尔基体是将蛋白质送往溶酶体、分泌性囊泡和质膜处的分拣中心。高尔基体的顺（cis）面从 ER 接受囊泡，而反（trans）面则将不同组的囊泡送往不同的靶子部位。囊泡也将蛋白质从高尔基体的一个槽库运至另一个槽库内。极化的细胞，例如上皮中的细胞，有一个顶端区和一个底侧区，有一紧密的接头把它们分开，以免两相混合。不同的蛋白质被送至这些不同的区域内。

将蛋白质从高尔基体的一个部分传至另一部分，然后传递到溶酶体或分泌性囊泡或质膜的囊泡是不同的。“出芽”和融合的机理目前尚不明了。对于这些传递过程中如何实现其专一

性，我们也毫无所知。例如，对于 ER 的功能所必需的膜本体蛋白，如 SRP 受体和 ribophorins，怎样会不被送至高尔基体之内，而保留在 ER 之中，我们就不清楚。不过，明确的是这些传递过程消耗能量，而且是单方向的。而且，在这些传递过程中膜的不对称性保留不变（见前图 29-50）。转运囊泡和高尔基体的空腔一侧的膜就相当于 ER 的空腔一侧。而当囊泡最终与质膜融合时，其空腔的表面就变成了质膜的外表面。因此，ER 膜和其他细胞器的膜的空腔一侧相当于质膜的外表面。因此之故，质膜中糖蛋白的糖的基团总是在细胞的外表面上。

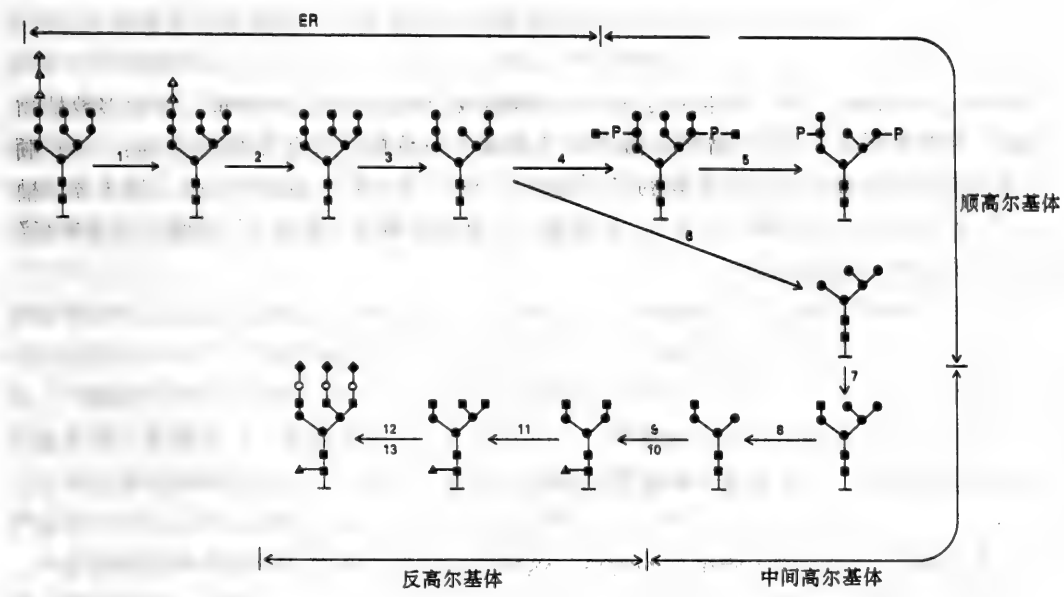


图 31-14 天冬酰胺-寡糖是在 ER 和高尔基体的三个部分中加工的。

催化这些步骤的酶是：(1) 葡萄糖苷酶 I，(2) 葡萄糖苷酶 II，(3) ER 的  $\alpha$ -1,2-甘露糖苷酶，(4) N-乙酰基-氨基葡萄糖 (GlcNAc) -磷酸转移酶，(5) 磷酸二酯糖苷酶，(6) 高尔基体的甘露糖苷酶 I，(7) GlcNAc 转移酶 I，(8) 甘露糖苷酶 II，(9) GlcNAc 转移酶 II，(10) 岩藻糖基转移酶，(11) GlcNAc 转移酶 IV，(12) 半乳糖基转移酶，(13) 唾液酸转移酶。步骤 4 和 5 仅适用于溶酶体中的酶。所用符号：空三角，葡萄糖；方形，GlcNAc；深黑圆形，甘露糖；空心圆圈，半乳糖；黑三角，岩藻糖；菱形，唾液酸；P，磷酸根。[据 D. E. Goldberg and S. Kornfeld. *J. Biol. Chem.* 258 (1983): 3160.]

糖蛋白的糖单位在高尔基体的每一个部分均发生修饰作用（图 31-14）。在顺高尔基体中，最终到达分泌性囊泡或质膜的蛋白质，其寡糖链中的甘露糖残基被除去。最终定位于溶酶体空腔中的糖蛋白，其糖单位则以不同的方式被修饰，如下所述。在某些细胞的中间高尔基体中，又有两个甘露糖被除去，而加上了一个 N-乙酰基氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基和一个岩藻糖残基。最后，在反高尔基体中，先加上半乳糖，再加上唾液酸，形成一复合的寡糖单位。糖蛋白中 N-连接的寡糖单位的结构决定于其构象和发生糖的加工作用的高尔基体中的糖基转移酶的组成。高尔基体中糖的加工名为末端糖基化 (terminal glycosylation)，以区别于发生在 ER 中的核心糖基化 (core glycosylation)。

## 甘露糖-6-磷酸是使溶酶体中的酶到达其最终归宿的标志物

把蛋白质从高尔基体送到溶酶体中的分子标志物已被鉴定出来。关键性的线索来自于**I-细胞疾病**（亦称粘脂质中毒，mucopolipidosis），这是一种溶酶体的贮藏疾病，是常染色体隐性遗传的。患I-细胞疾病的病人有严重的精神运动的迟缓和肌肉的畸形。他们的溶酶体内有大的内含物（inclusion），这是未被消化的多聚氨基葡萄糖和糖脂类——因此这种疾病称为I-细胞病。这些内含物之所以存在，是因为溶酶体受到影响，缺少了降解这些物质所需要的8种酸性水解酶类。与之相反，患病病人的血和尿中却存在着非常大量的这些酶。因此，合成了有活性的酶，但这些酶不是被集中到溶酶体中，而是被运出细胞之外了。换言之，在**I-细胞病**中，一整套酶被放在错误的位置上了。这些酶通常含有甘露糖-6-磷酸残基，但在I-细胞病中，甘露糖未被修饰。随后的研究表明，甘露糖-6-磷酸残基是一种标志，通常它指令许多水解酶从高尔基体进入溶酶体中去。

最终将被传送到溶酶体中的酶在顺高尔基体中获得甘露糖-6-磷酸的标志。活化的磷酸基的供体是UDP-N-乙酰基氨基葡萄糖。磷酸转移酶催化甘露糖残基的6'-OH对此活化的供体中焦磷酸键的攻击。于是，N-乙酰基氨基葡萄糖就通过磷酸二酯键而连在甘露糖上。然后磷酸二酯酶将此键水解，在核心寡糖中产生了甘露糖-6-磷酸残基。**I-细胞病人缺乏催化第一步的磷酸转移酶**；其后果是8种必需的酶的到位发生了错误。这种磷酸转移酶是识别力极高的酶。它对于分离的寡糖单位中的甘露糖残基不起作用，对于含有此单位的肽也不起作用。这种转移酶能识别一种三维结构的特点，这种特点仅存在于位于溶酶体中的糖蛋白中。

甘露糖-6-磷酸又怎样起标志物的作用而决定向溶酶体中转运呢？高尔基体中含有一种受体，它是一种膜本体蛋白，它能专一地识别甘露糖-6-磷酸单位，并与有此标志的蛋白质相结合。含有这种蛋白质-受体的囊泡是从反高尔基体的边缘上“芽生”出并落下来的（见图Ⅲ-31-12）。然后这些载体与起分拣作用的囊泡融合，这些囊泡比高尔基体酸性强（pH5.0），因为其中有质子泵。较低的pH导致带标志物的糖蛋白与其受体解离。此外，磷酸酶又将甘露糖-6-磷酸部分中的磷酸基除去，这又进一步促进了溶酶体酶被释放到囊泡中去。在此阶段，含有溶酶体酶的囊泡从起分拣作用的囊泡上以“出芽”的方式掉下来，并通过融合作用将其内含物传至溶酶体中。

与膜结合的甘露糖-6-磷酸的受体再通过另外一系列的囊泡回到高尔基体中。这种受体也和许多其他的受体一样，是再循环的，因此可使用多次。下列发现证明了这一循环中酸化作用的重要：使起分拣作用的囊泡变得不那么酸的药剂会阻断蛋白质被运入溶酶体中。例如， $\text{NH}_4\text{Cl}$ 和氯奎使分拣囊泡中的pH上升，即导致本应进入溶酶体的酶被运出细胞，而不是运入溶酶体。原因是：假如分拣囊泡不够酸，酶-受体复合物就不会解离，因而受体不会回到高尔基体中去。没有受体，新形成的含有甘露糖-6-磷酸的糖蛋白就沿着分泌的途径进行下去而被运至细胞之外。



## 分泌的和质膜的蛋白质不以糖类的标志物为根据而被送到位

发现了甘露糖-6-磷酸是使溶酶体中的酶到位的标志物,于是人们推测,别的糖单位可能被用于指导蛋白质从高尔基体中被运至其它处所。利用糖基化作用的抑制剂,如突尼卡霉素(tunicamycin),对这一假说进行了检验。突尼卡霉素阻断N-连接的糖基化作用,因为它抑制N-乙酰氨基葡萄糖与长萆醇磷酸的加成作用,这是形成核心寡糖的第一步(前图29-46)。在突尼卡霉素存在下瞬时进入高尔基体的蛋白质不能获得N-连结的糖。如所预期,在经突尼卡霉素处理过的细胞中,通常应被运入溶酶体的酶类不能到位,而是被分泌出细胞之外。但与之相反,突尼卡霉素的处理实质上不影响大多数分泌的蛋白质和质膜本体蛋白的到位。这一发现表明,在这些类蛋白质的分拣中,糖的部分并非普遍地起着识别标志的作用。虽然如此,假若N-或O-连结的糖基化作用被抑制,有些蛋白质的转运也受到阻碍。例如,在使低密度的脂蛋白受体到达质膜方面,O-连结的糖基化作用就是重要的。这些糖本身并不起标志物的作用,但它们大概使得蛋白质取得一种构象,而这种构象是分拣机器所能识别的。

分泌的蛋白质和质膜本体蛋白质的被送到位的信息位于其中一小段氨基酸顺序中吗?比较其氨基酸顺序,并未发现任何相当的可被酶切的、指导着许多种蛋白质进入ER的信号顺序。使蛋白质到位的信息来自于三维的特点——信号斑块(signal patch)——而不是来自于类似于信号顺序的线性的标志物。值得注意的是,由高尔基体所分拣的蛋白质实质上都是充分折叠的,与信号识别颗粒所检阅的大部分未折叠的新生链完全不同。

那么大多数糖蛋白的寡糖基团的作用是什么呢?我们正在开始研究为什么自然要发展一种复杂的机关,将糖单位插入许多蛋白质中,而且还要对这些单位进行修饰。如前面一章(第14章)所讨论的,糖类是高度极性的、高度亲水的分子。因此,它们增加糖蛋白的水溶性,并保证含有连在其上的寡糖的蛋白质区域面向水的介质。第二,糖单位使糖蛋白稳定。例如,抗体的糖蛋白单位就保护它使免被蛋白酶消化。第三,糖类能起标志物的作用,使得蛋白质被摄取并随后被破坏,如肝脏除去老化的血浆糖蛋白那样(第14章)。第四,ER和高尔基体对糖类的加工可能决定着糖蛋白通过这些细胞器而移动的步伐,并有助于保证消磨了足够的时间以达到成功的高度准确的分拣。

## 蛋白质可被送到质膜的特定区域和分泌性囊泡中

由于在许多细胞中蛋白质最终可到达的位置有许多个,所以分泌性蛋白质和膜本体蛋白质如何到位的问题就更为有趣了。极化的细胞,如上皮细胞,可分为顶端部分和底侧部分。固定在这些区域中的蛋白质由于膜中的障碍——称为紧密接头(tight junction,图Ⅲ-31-12)而不能互相混合。一种膜本体蛋白被运至或是顶端或是底侧部分,但不能被运至两处。由膜包被的病毒的复制是深入认识这种到位过程的源泉(本章后面)。为流感病毒所感染的细胞将未来的病毒外壳蛋白由高尔基体运至顶端的质膜,这是形成新的病毒颗粒的出芽部位。与此相反,水泡性口膜炎病毒(VSV)的未来的外壳蛋白则被送至底侧的质膜。将蛋白质分送至顶端质膜的囊泡与那些移向底侧质膜的囊泡不同。这两种囊泡之间的区别或是当它们从反高尔基

体上芽生出来时形成的，或是在其后不久形成的。

许多细胞有一种以上的分泌途径。这些细胞中的分泌性蛋白质可被送至**组成性囊泡**中，或被**调节的囊泡**中。组成性的分泌迅速，而且是连续的。反之，被调节的分泌是由专一的信号插曲式地引发的。蛋白质以极高的浓度（高达 ER 中的 200 倍）被贮存起来，这使得被调节的囊泡在电镜下不透明。例如，消化酶的前体就贮藏在胰脏的腺泡细胞的被调节的囊泡中。进餐后激素的刺激导致这些囊泡与顶端质膜相融合，并将其糖蛋白释放到胰腺道中。与此相反，这些细胞紧下面的胞外衬质的组分则连续不断地被组成性囊泡所释放，这些囊泡是与底侧质膜相融合的。分泌性蛋白质被送至组成性囊泡或被调节的囊泡中，这些囊泡则在反高尔基体中或其后的部分中。

将蛋白质送至被调节囊泡中的到位信号尚未被破译，但用培养的小鼠细胞系所进行的遗传工程实验提供了模模糊糊的线索。促肾上腺皮质激素（ACTH）贮存在这些细胞的被调节的囊泡中，并且因专一的刺激而释放出来。用胰蛋白酶原（通常由胰脏的腺泡细胞分泌的酶原）的 cDNA 转染这些细胞导致此前体的合成以及它和 ACTH 在被调节囊泡中的贮藏。这一发现有力地说明：**内分泌细胞**（将激素分泌到血液中的）和**外分泌细胞**（将消化酶和其它物质分泌到消化道中的）利用类似的信号使它所分泌的蛋白质到达被调节囊泡中。

另一项富于信息的发现是加入氯奎会使 ACTH 从其正常的调节的分泌途径转向组成性途径。氯奎干扰细胞区域的酸化作用，因而它阻止了膜受体的再循环，而膜受体是识别那些最终到达调节的囊泡的蛋白质的。这项实验和其他实验导致下列一般原理：**ER 腔中的可溶性蛋白质出现在组成性的分泌性囊泡中并被运出去，除非有特殊的信号指令它们到其它部位去。同样，起初在 ER 中的膜本体蛋白则走入质膜中，除非这些蛋白质带有与此相反的指令。**换言之，分泌性囊泡和质膜都是首选的目的地。

## 细菌也利用信号顺序使蛋白质到位

使蛋白质到位并不是真核细胞的发明。细菌也会使蛋白质到达其顺序中已编码的目的地。革兰氏阴性细菌，如大肠杆菌可能将胞浆中的核糖体新合成的蛋白质送到**质膜（内膜）**中，或外膜中，或两层膜之间的**周质空间**中，或（很少）送到**胞外介质**中。关于周质中和外膜中蛋白质的到位了解得最清楚。氨基末端的信号顺序（也称为引导顺序）非常像真核生物的分泌性蛋白质中的信号顺序，它指令细菌的蛋白质穿过质膜和外膜，大概也是借助于与真核生物的信号识别颗粒类似的一种组装体。也像在真核生物中一样，信号顺序通常是由一种信号肽酶切下去的。另一相似之点就是多肽链的延长和转运通常是大致同时发生的，但并非机械地偶联在一起。跨过原核生物质膜的转运是由质子推动力驱动的，而不是由 ATP 或别的高能分子的磷酸基转移势驱动的。由 sec（分泌性）基因编码的蛋白质可能是转运机关中的组分。

使蛋白质到位的某些组分在进化上似乎是非常保守的。在植物的核糖体上合成的新生的原核生物的分泌性蛋白质（ $\beta$ -内酰胺酶）的信号顺序能够正确地被哺乳动物的 SRP 所识别。细菌的和真核生物的信号肽酶的专一性也非常相似。了解识别和转运的其它分子组分是否也同源，将是有趣的。

## 线粒体中的大部分蛋白质是在胞液中合成， 再运入此细胞器的

线粒体 DNA 编码线粒体中的所有 RNA，但编码很少几种其中的蛋白质。线粒体中的大部分蛋白质是由核 DNA 编码，并在胞液中由游离的核糖体合成的。这些蛋白质如何到达其目的地呢？这个问题很有趣，因为线粒体中的蛋白质存在于 4 个地点：外膜、内膜、膜间空间和衬质。沙茨 (G. Schatz) 发现，重要的线粒体蛋白质的氨基末端顺序决定着蛋白质在线粒体中最终的存在部位。一种蛋白质进入线粒体需要有特殊的顺序，这种顺序为这种细胞器的外膜中的一种受体所识别。进入线粒体的顺序与进入内质网的信号顺序不同，前者富于带正电荷的残基，还富于丝氨酸和苏氨酸。如果这一顺序之后是固定在膜中的顺序和第二个带正电荷的顺序，那么这种蛋白质就留在外膜中。例如，使主要的 (70kd) 外膜蛋白到达并固定在外膜中所需要的信息就在于其氨基末端的 41 个残基中，这一段是不被切掉的。

线粒体蛋白质到达其他 3 个部位就比较复杂。内膜参与它们的转运。它们的转运确实需要跨越此膜的质子推动力，而外膜蛋白的输入则什么也不需要。解联剂的加入（如二硝基酚）阻断这些蛋白质由外膜向内部的运送，因为解联剂耗散了质子推动力。第二个区别是，差不多被转运到内膜、衬质和膜间空间的所有蛋白质，都是经过蛋白酶水解的，而外膜中的蛋白质则没有变化。被酶切掉的氨基末端的使蛋白质到位的顺序称为前顺序 (pre-sequence)。

以衬质为目的地的蛋白质是通过其前顺序与外膜中的受体结合而进入线粒体的。然后它在一粘着部位跨过内、外两重膜，因为这两层膜在粘着部位上是贴在一起的。现在前体蛋白质已在衬质中了，然后衬质中的可溶性金属蛋白酶将其切开，产生成熟的蛋白质。

内膜的蛋白质和膜间的蛋白质，也像衬质中的蛋白质一样，是在粘着部位进入线粒体中。但是只有细胞色素  $b_5$  前体的氨基末端区域能跨过内膜，金属蛋白酶在衬质侧将它切开。血红素与留下来的多肽链结合，然后第二种蛋白酶在内膜的外面将此多肽键切断，从固定在膜上的蛋白释放出可溶性的细胞色素  $b_5$ 。因此，蛋白质先将其前体固定在内膜中，然后切断膜中的柄而把自身安置在膜间空间之内。内膜中的蛋白质，如细胞色素  $c_1$ ，也是以类似方式加工的，不过它的前体有 3 个跨膜片段。经蛋白酶水解除去固定在膜中的氨基末端后，还有 2 个片段留在膜中。

## 通过前顺序的连接，胞液中的蛋白质可再受指令 进入线粒体中

用遗传工程方法所产生的嵌合蛋白质的研究提供了强有力的证据，说明远端的氨基末端顺序能使线粒体中的蛋白质到位。二氢叶酸还原酶 (DHFR) 是一种胞液中的酶，在其氨基末端上再连接一段线粒体的前顺序，就可指令它进入线粒体。例如，连接上细胞色素  $c_1$  的 61 个残基的前顺序，就可使 DHFR 被运入膜间空间，这是细胞色素  $c_1$  的生理部位。

另一方面，将一种衬质中的酶（乙醇脱氢酶同功酶）的 27 个残基的前顺序连在 DHFR 的氨基末端上，就可将此酶放在线粒体衬质中。第三种嵌合蛋白质的定位也很说明问题。当只把细胞色素  $c_1$  的 61 个残基的前顺序中的前面 35 个残基连接在 DHFR 上时，此酶出现在衬质

中，而不在膜间空间内。这一实验证明前顺序的第 36 至第 61 个残基这一段是**终止转移**的顺序，它阻止膜间的蛋白质和膜内的蛋白质进入衬质。似乎可能的是，从位置 36 开始的 19 个不带电荷的残基这一段是固定在膜中的，这一段终止进入衬质的转运。

接上了线粒体酶的前顺序的 DHFR 向线粒体中的运输为氨甲蝶呤所抑制，这是叶酸的拮抗物，它与 DHFR 结合得很牢。但氨甲蝶呤并不阻断真正的线粒体蛋白质的转运。叶酸的这种拮抗物也不干扰前顺序-DHFR 嵌合蛋白质与线粒体外膜上受体的结合。氨甲蝶呤大概是通过干扰 DHFR 链的伸展而阻止此嵌合蛋白质运入线粒体衬质。这些结果有力地说明，在蛋白质的跨膜转运过程中，它们必须是部分地或完全地伸展着的。

### 叶绿体中的大部分蛋白质也是根据其前顺序而被输入和分拣的

叶绿体中的大部分蛋白质，也像线粒体中的一样，是由细胞液中的核糖体合成并输入的。运入叶绿体中的蛋白质有 6 种可能的目的地：外膜、内膜、膜间空间、基质、类囊体膜和类囊体空腔。与内膜分离的类囊体膜的存在产生了两个比线粒体中更多的部位。和线粒体中一样，蛋白质的到位主要取决于其**氨基末端的前顺序**。叶绿体的前顺序（亦称为转运顺序，transit sequence）与线粒体的前顺序相似，都带正电荷并富含丝氨酸和苏氨酸残基。事实上，由一种植物的酶核酮糖二磷酸羧化酶的小亚基衍生出来的叶绿体中的前顺序，能够在体外有效地使胞液蛋白质被送到酵母的线粒体中去。研究此酶在体内为什么仅被运入叶绿体中将是很有意义的。

到达基质和到达类囊体的叶绿体蛋白质的前顺序在转运过程中被酶切掉。转运的动力来自于 ATP 的水解，而不是质子电力。以类囊体空腔为目的地的蛋白质的前顺序似乎含有两种信号。氨基末端的信号导致前体蛋白质被运入叶绿体的基质内。前顺序的这一部分在基质中或到达基质的途中被切去，于是暴露出第二个信号，它指令已被修饰过的前体穿过膜而被转运。以基质为目的地的蛋白质缺乏这第二种信号。下列发现支持上述工作假说：当质体蓝素（通常位于类囊体空腔中）本身的前顺序为铁氧还蛋白（基质中的蛋白）的前顺序所取代时，质体蓝素就被指令进入基质中去。

### 核定位信号使得蛋白质通过核孔而迅速进入核内

真核细胞的核是由核被膜包围着的，核被膜则由两层膜——**内核膜和外核膜**——组成，其间为核周空间所隔开。外核膜与粗内质网是连续的，而核周空间则与 ER 的空腔是连续的。细胞核中的所有蛋白质都是在细胞液中由游离的核糖体合成的。DNA 聚合酶类、RNA 聚合酶类、组蛋白类和核中的其它蛋白质是怎样越过核被膜的呢？这种有选择性的障碍上有开口，称为**核孔**，其直径约 70 Å（图 III-31-26）。小的蛋白质（~15kd）如组蛋白可迅速进入，而大的蛋白质（>~90kd）则被排斥在外，除非它们有特殊的信号。这种信号也能加速小蛋白质的进入。

SV40 病毒的 T 抗体是一种 92kd 的蛋白质，它调节病毒 DNA 的转录和复制。研究 T 抗体在细胞核中的积累，发现这种大蛋白质之转运入细胞核决定于一种**核定位顺序**的存在，此顺

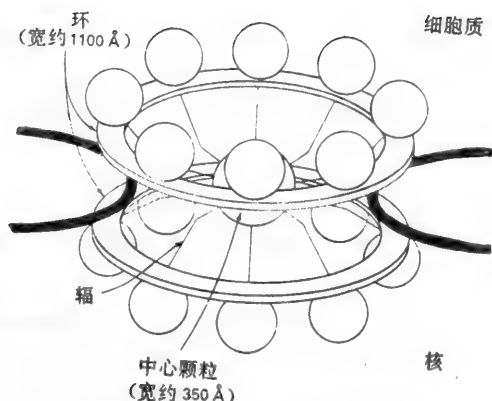


图 II-31-26 核膜结构的模型。

序含有 5 个连续的带正电荷的残基：

-脯-赖-赖-赖-精-赖-缬-

128

只要改变一个残基就会使这一顺序失活。例如，残基 128 上的赖氨酸被苏氨酸或天冬酰胺取代的 T 抗体就停留在细胞液中。

将这种病毒的七肽顺序连结到一种通常定位于细胞液中的蛋白质上，能使它进入细胞核吗？曾以丙酮酸激酶作过试验，这是由 58kd 的亚基组成的四聚体，通常位于细胞浆中。通过重组 DNA 技术，将编码到位顺序的 cDNA 与编码激酶的 cDNA 接在一起。然后用显微注射法将含有此嵌合 cDNA 的质粒注入哺乳动物的细胞中。含有这种 SV40 核定位顺序的丙酮酸激酶几乎仅仅存在于细胞核中。与此相反，带有被改变的核定位顺序（在位置 128 上苏氨酸取代了赖氨酸）的丙酮酸激酶则停留在细胞液中。将这种病毒的七肽连接到许多种其它的胞液中的蛋白质上，在每种情况下均导致它们定位在细胞核中。因此，一种短肽能指令蛋白质进入细胞核。与到此为止已讨论过的大多数其它的到位顺序不同，核定位信号是不被酶切掉的。

## 特殊的蛋白质通过以受体为媒介的胞吞作用而被运入细胞内

现在我们来讨论蛋白质到位的另一个方面——特殊的蛋白质是通过它们与质膜中的受体相结合，并被包入囊泡中而被运入细胞的。这种以受体为媒介的胞吞作用具有广泛的生物学意义。第一，它是将必需的代谢物运入细胞的方式。如前所述，带有胆固醇的低密度脂蛋白 (LDL) 是由质膜中的 LDL 受体摄取而进入细胞的。同样地，结合在钴氨素传递蛋白 II (transcobalamin II) 上的维生素 B<sub>12</sub> 和结合在铁传递蛋白上的铁也是被细胞表面的受体所识别，并运入细胞的。第二，胞吞作用调节着对于多种蛋白质类激素和生长因子的反应。胰岛素、上皮生长因子和神经生长因子都是结合在其受体上被摄入细胞并与受体一道被降解的。胞吞作用从循环中除去这些激素，并通过减少受体的数目而使细胞对它们的反应暂时不那么灵敏。第三，被运去进行破坏的蛋白质被胞吞作用所摄取，并运入溶酶体中进行消化。例如，吞

噬细胞有受体,所以它可以摄取抗原-抗体复合物。肝细胞摄取并破坏衰老的血浆糖蛋白,这种糖蛋白的标志是由于其寡糖链末端丢失了唾液酸残基而使半乳糖残基暴露在外。第四,许多病毒和毒素利用以受体为媒介的胞吞作用而得以进入细胞。即将讨论生里基森林病毒(Semliki Forest Virus)的巧妙的进入和离去的方式。第五,以受体为媒介的摄取的紊乱能引起疾病,某些形式的全家族的高胆固醇血病就是例子。

## 笼形蛋白形成一围绕着有壳小孔的多面晶格而参与胞吞作用

对胞吞现象起媒介作用的大多数位于细胞表面的受体都是跨膜的糖蛋白。它们有一个大的胞外的结构域,一个或两个跨膜的螺旋和一小部分在细胞液中的区域。铁传递蛋白和去唾液酸糖蛋白(asialoglycoprotein)的受体就是例子。许多这类受体位于质膜的称为有壳小孔(coated pit)的特化区域中。这些刻纹的胞液侧之上有笼形蛋白(clathrin)的厚壳,笼形蛋白是能形成围绕着膜囊泡的晶格的蛋白质。有壳小孔约占典型的动物细胞表面的2%左右。许多受体(如LDL、铁传递蛋白、去唾液酸糖蛋白和胰岛素的受体),不管其上是否结合有配体,都会聚集在有壳小孔中。其它一些受体(如上皮生长因子的受体),则在与其配体蛋白结合之后才聚集在有壳小孔中。

以受体为媒介的胞吞作用开始于有壳小孔的内陷。笼形蛋白围绕着有壳小孔形成晶格,将它从质膜上切下来形成有壳囊泡,其直径约800Å。有壳囊泡迅即丢掉其笼形蛋白的外壳,形成一内小体(endosome,亦称受体小体receptosome)。内小体彼此互相融合,形成直径由2000至6000Å的囊泡。有壳小孔转变为内小体约需20秒钟。内小体的一个重要特点就是它们的酸性,这种酸性使大多数蛋白质-受体复合物解离,于是这两个伙伴就可以分道扬镳。因此,分拣的决定是在内小体中作出的。

笼形蛋白容易形成封闭的多面体晶格的结构基础是什么呢?笼形蛋白是三条重链(H, 180kd)和三条轻链(L, ~35kd)的三聚体。在无二价阳离子存在时和碱性pH下从壳上溶解下来的(HL)<sub>3</sub>。笼形蛋白单位(8S, 650kd),其电镜照片呈现显著的特征。它是一种由3个弯曲的枝由中心点辐射而成的三枝图形(triskelion)。三条重链的羧基末端,各长约500Å,交汇在一个顶点上。重链中有一折点,折点把链分成两部分,一个离顶点最近的单位,一个较远的单位。每条轻链则与重链的远的单位并排在一起。将提纯的三聚体在pH6的含Mg<sup>2+</sup>缓冲液中透析,它就自动地重新聚集成一密闭的像灯笼样的形状。这种密闭的多面体是由五角形和六角形组成的,单用五角形或单用六角形不可能造成二十面体的壳状。此多面体上每一个面的边棱都是由4个三枝图形的几个部分组成的,2个近的单位 and 2个远的单位。三枝图形的易变性使得它既能适合于五角形,又能适合于六角形。

在体外单独由三枝图形可以形成大小不同的各种各样开口的和密闭的晶格。在体内则有更多的蛋白质参与。一种180kd的笼形蛋白组装蛋白(clathrin assembly protein,与H链不同)促进三枝图形结合在一起形成有规则的多面体,这种多面体与有壳囊泡的极为类似。质量在100kd至110kd的好几种蛋白质参与笼形蛋白与有壳囊泡的膜的结合。在胞吞作用中从有壳囊泡上释放笼形蛋白也是一个关键性步骤,因为围绕着囊泡的蛋白质外壳的存在会阻碍它将输入的蛋白质和受体送到其目的地。笼形蛋白是由一种为ATP所推动的去壳酶(uncoating enzyme)而得以再循环的。每有一个三枝图形从多面体晶格上被除去,就有三个ATP被这种



70kd 的蛋白质水解。显然，通过非共价结合的相互作用而形成晶格在热力学上是有利的，而它的破坏则需要输入自由能。

被胞吞的蛋白质和受体在酸性内小体中被分拣

对于已发生胞吞作用的所有蛋白质，其共同途径都是从有壳小孔到有壳囊泡，再到内小体。进入细胞的蛋白质和受体然后就分道扬镳。ATP 推动的质子泵使内小体酸化，这导致蛋白质-受体复合物的解离，这是它们的分拣和到位的前奏。铁传递蛋白及其受体所采取的途径说明了 4 种可能途径之一。铁传递蛋白把铁从吸收和贮藏部位转运到利用部位。每一 77kd 的蛋白质结合 2 个  $\text{Fe}^{3+}$ ，此蛋白质有 2 个类似的结构域。没有铁的铁蛋白称为铁传递蛋白本体 (apotransferrin)。  $\text{Fe}^{3+}$  与铁传递蛋白本体的结合涉及  $\text{HCO}_3^-$  和阴离子形式的酪氨酸侧链。铁传递蛋白而不是铁传递蛋白本体，能与有壳小孔中的二聚体受体结合。在到达内小体时，铁从铁传递蛋白上解离下来，因为内小体已被酸化到 pH5 至 6。这种酸性使得铁传递蛋白对  $\text{Fe}^{3+}$  的亲和力降低了一百万倍还多。酸化使重碳酸根、酚羟基  $\text{O}^-$  和其它对结合作用有贡献的基团质子化，从而导致  $\text{Fe}^{3+}$  的释放。不过，铁传递蛋白本体仍结合在受体上 (图 III-31-33)。

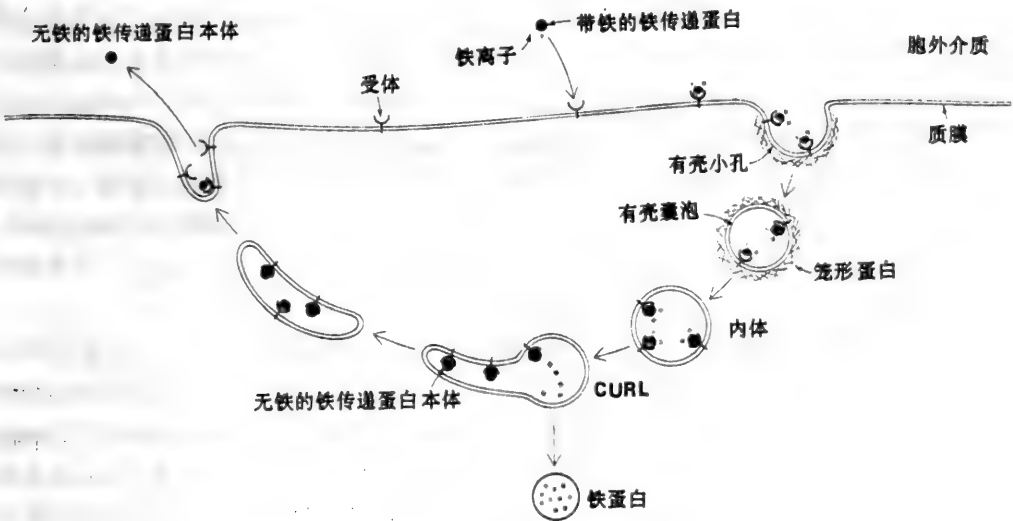


图 III-31-33 铁传递蛋白的胞吞途径。

铁在酸性内小体中被释放。铁传递蛋白本体和受体则再循环。

[据 A. Dautry-Varsat and H. F. Lodish. *How receptors bring proteins and particles into cells.* ]

然后内小体与一管状囊泡融合。此管状囊泡名为 CURL (意为受体和配体解联的部分, compartment of uncoupling of receptor and ligand), 分拣在其中进行: 含有结合在受体上的铁传递蛋白的那一部分囊泡掉下来, 并被指令到达质膜, 而留下的  $\text{Fe}^{3+}$  则贮存在细胞液中的铁蛋白中。当掉下来的囊泡与质膜融合时, 铁传递蛋白本体就从受体上释放出来, 因为 pH 发生了突然的变化。在 pH7.4 下铁传递蛋白本体对受体几乎没有亲和力。所以, 利用了两次 pH 的变化来推动转运的循环: 第一次是在内小体中使铁从铁传递蛋白上释放出来, 第二次是把铁传递蛋白本体释放到胞外的液体之中。铁的载体和受体两者都发生再循环而几无损失。此循环

共经约 16 分钟：4 分钟用于结合铁传递蛋白，5 分钟用于转运至内小体中，7 分钟用于把铁载体和受体归还到细胞表面。通过这种途径，肝细胞每分钟可摄取大约 20,000 个铁原子。

表 Ⅲ-31-1 以受体为媒介的胞吞作用的 4 种方式

方式	受体的命运	蛋白质的命运	实 例
1	再循环	再循环	铁传递蛋白，主要的组织亲和性蛋白
2	再循环	降解	低密度脂蛋白，钴氨素传递蛋白Ⅱ
3	降解	降解	上皮生长因子，免疫复合物
4	转运	转运	母体免疫球蛋白 G，免疫球蛋白 A

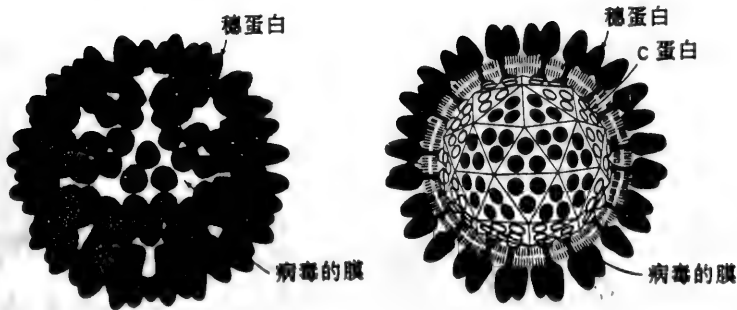
铁传递蛋白本体和铁传递蛋白受体两者的再循环说明了以受体为媒介的胞吞作用的一种方式。已知还有另外 3 种运作方式（表 Ⅲ-31-1）。LDL 途径（第 23 章）代表着受体再循环，而胞吞进来的蛋白质则被送至溶酶体中进行消化这样一种方式。溶酶体的 pH（4.5 到 5）低于内小体的。这种酸性环境活化溶酶体中的蛋白酶，也使最终要被破坏的蛋白质伸展开。胞吞作用的第三种方式中，受体和转运进来的蛋白质两者都被送到溶酶体中被消化。以受体内媒介的胞吞作用也用于将蛋白质从极化细胞的一面转运到相对的一面去。例如，新生儿的小肠上皮细胞摄取从母乳中得到的抗体。含有结合在受体上的母体的抗体的胞吞囊泡被指令到达细胞的另一侧（靠着血管），并在此处与质膜融合。母体的抗体是怎样被释放的呢？在胞吞囊泡中时，受体被切成两部分，所以被转运过去的抗体就带着受体的一小段而从细胞中伸出来。这一小段称为**分泌组分**。因此，在将抗体分子从质膜的一面转运至相对一侧时，受体就牺牲了。

胞吞作用中酸所诱导的蛋白质-受体的解离可因加入可透过的碱而阻断。例如， $\text{NH}_4\text{Cl}$  以  $\text{NH}_3$  的形式进入细胞及其内部的区域， $\text{NH}_3$  极易穿过双分子层的膜。 $\text{NH}_3$  在此区域内获得质子，从而提高其中的 pH。有机碱，如氯奎 [chloroquine,  $\text{ClC}_6\text{H}_5\text{N}-\text{NH}-\text{CHCH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ]，也以同样方式起作用，而使内小体和溶酶体的 pH 与胞液的 pH 平衡。加入离子载体也可提高这些区域的 pH，离子载体使空腔中的  $\text{H}^+$  与细胞液中的  $\text{K}^+$  相交换。所有这些药剂均阻断胞吞进去的蛋白质的释放，阻断受体的再循环和阻断溶酶体中降解性酶的作用。

许多种病毒和毒素通过以受体为媒介的  
胞吞作用进入细胞

有膜包被的病毒利用胞吞途径进入细胞，利用胞泌途径离开细胞。**生里基森林病毒(SFV)** 生活史的研究使我们深入了解膜包被的病毒如何利用寄主细胞使蛋白质到位的能力。SFV 是一种 RNA 病毒，它感染蚊虫，因乌干达的雨林而得名。它和引起人的黄热病的病毒极为相近。SFV 的 12.7kb 的 RNA 为 G 蛋白的 180 个拷贝所包围（图 Ⅲ-31-35）。这种核蛋白衣壳为一脂类双分子层所包被，双分子层含有 180 个穗糖蛋白 (spike glycoprotein)，每一蛋白分子又由



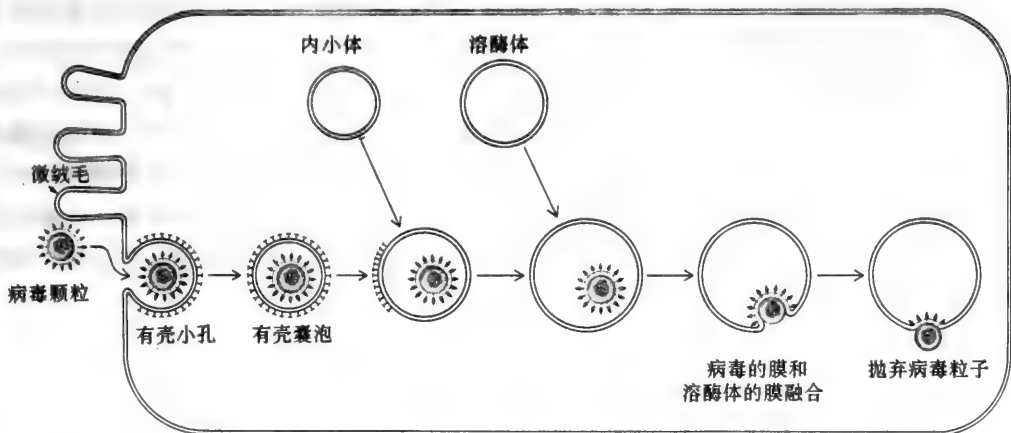


图Ⅲ-31-35 膜包被的病毒生里基森林病毒(SFV)结构示意图。

[据 K. Simons, H. Garoff, and A. Helenius, *How an animal virus gets into and out of its host cell.* ]

3个亚基组成。E1和E2亚基各包括一个大的外部的结构域，一个单个的跨膜螺旋和一个短的羧基末端区，此末端区与核衣壳的C蛋白接触。小的E3蛋白则与E2的外部结构域结合。这些亚基都是由一共同前体酶切而产生的。

被感染细胞的电镜照片表明病毒颗粒在有壳小孔中，在有壳囊泡中，也在内小体中。显然，SFV是通过与有壳小孔中的受体相结合而进入敏感细胞中，然后再被胞吞的(图Ⅲ-31-36)。内小体的酸性环境导致了感染所必需的构象变化。E1糖蛋白改变形状，并引发了病毒的膜与内小体膜的融合。因此，核衣壳就被释放到细胞浆中。酸化作用的抑制剂由于阻断了这一释放步骤而阻碍感染。



图Ⅲ-31-36 生里基森林病毒通过以受体为媒介的胞吞作用进入敏感细胞。

内小体的酸性环境引发了膜的融合和病毒粒子的释放。[据 K. Simons, H. Garoff, and A. Helenius.

*How an animal virus gets into and out of its host cell.* ]

然后病毒RNA被翻译，并被复制。C蛋白是在游离的核糖体上合成的。反之，糖蛋白的前体含有信号顺序，这些顺序指定合成它的核糖体把它送到内质网去。这些病毒糖蛋白在高尔基体中加工，并被送到质膜中去，并在其中聚集(图Ⅲ-31-37)。含有RNA和C蛋白的新

合成的病毒粒子与这些病毒穗蛋白相互作用。当穗蛋白与 C 蛋白之间形成越来越多的键时，质膜就卷曲，包围病毒颗粒。最后，当 180 个 C 蛋白全都与穗蛋白结合时，围绕着病毒的膜壳即从质膜上掉下来，把病毒颗粒释放到胞外空间中去。在以后的一章（第 34 章）中将要讨论到，流感病毒也是一种膜包被的病毒，它利用类似的机理进入细胞和离开细胞。

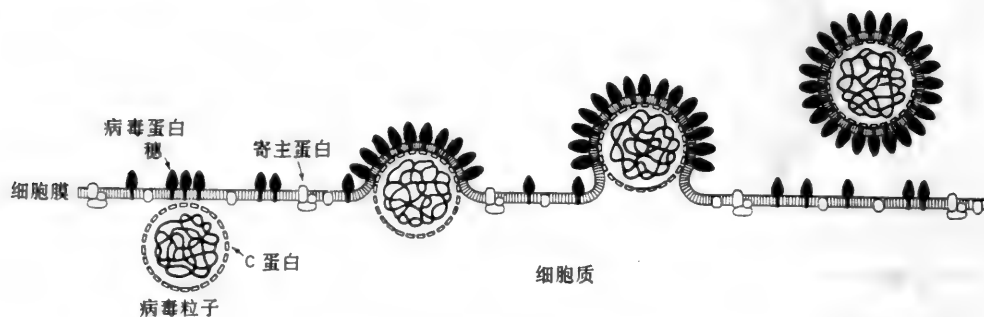


图 31-37 新形成的生里基森林病毒颗粒在膜上组装，并从中释放。

[据 K. Simons, H. Garoff, and A. Helenius. *How an animal virus gets into and out of its host cell.* ]

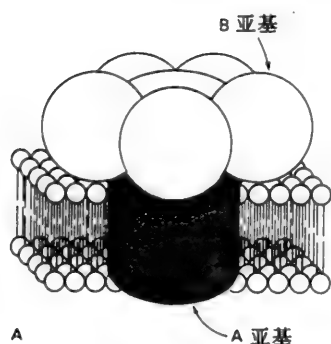


图 31-38 霍乱毒素的结构。

完整的毒素分子的示意图。

许多毒素也通过以受体为媒介的途径进入细胞。例如，白喉毒素是 61kd 的蛋白质，有 2 个结构域，当它的 B 结构域与一种细胞表面的受体结合后，此蛋白即进入细胞。在内小体中，由于一个肽键被切断和一个链间的二硫键被还原，这两个结构域被分开。A 片段由于催化白喉酰胺 (diphthamide) 的 ADP-核糖基化反应，故抑制蛋白质的合成。白喉酰胺是延长因子 2 的经过修饰的组氨酸残基。内小体的酸化导致 A 片段被释放到细胞液内，大概是由于引发了 B 片段的疏水部分插入到内小体的膜中。霍乱毒素也是由催化单位 (1 条 A 链) 和透过膜的单位 (5 条 B 链) 组成的。其 A 链催化一种关键性的信号-偶联蛋白的 ADP-核糖基化，这导致腺苷酸环化酶的持续活化。五聚的 B 单位与神经节苷脂  $GM_1$  结合， $GM_1$  是这种毒素的细胞表面上的受体。因此 B 蛋白就使得 A 链能以进入细胞液中。

## 泛素使蛋白质到达被破坏处

蛋白质也被送到被破坏的处所。蛋白质的半衰期有显著的不同。有些蛋白质周转得非常快，而另外一些则非常稳定。在代谢调节中重要的酶大多寿命短，这就使得它们的浓度可迅速改变，因此活性也可迅速改变。在除去不正常的蛋白质方面，有控制的降解也是重要的。由于翻译中的错误，有相当一部分新合成的蛋白质分子是有缺陷的。况且，蛋白质会发生氧化性的破坏，随着时间的推移，蛋白质也会以别的方式发生变化。细胞具有检测和除去已破坏的蛋白质的机理。

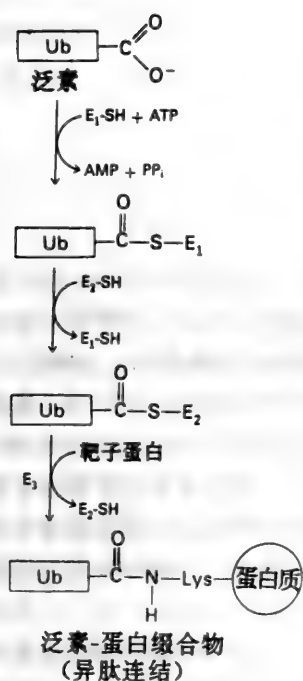


图 Ⅲ-31-39 泛素的活化及其与将送去降解的蛋白质的连结。

泛(激)素是存在于所有真核细胞中的小分子(8.5kd)蛋白质,在把蛋白质送去破坏方面它起着重要作用。这种蛋白质在进化上是高度保守的:酵母和人的泛素在76个残基中只有3个是不同的。泛素的羧基末端的甘氨酸与将被送去降解的蛋白质的赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基发生共价连接。形成这些异肽键(isopeptide bond)所需的能量来自ATP。3种酶( $E_1$ ,  $E_2$ 和 $E_3$ )参与泛素与蛋白质的接合。首先,泛素的末端羧基通过硫酯键而与 $E_1$ 的硫氢基相连(图Ⅲ-31-39)。这一由ATP推动的反应与脂肪酸的活化和氨基酸的活化均相似。然后活化的泛素被传到 $E_2$ 的硫氢基上。最后, $E_3$ 催化泛素从 $E_2$ 传递到靶子蛋白上。一个被送去破坏的蛋白质分子通常得到几个泛素分子。目前还不知道泛素在蛋白质上的存在如何引起蛋白质的水解。

什么决定着蛋白是否与泛素结合呢?原来有一种信号是简单得出人意料。细胞液中蛋白质的半衰期是由它的氨基末端残基所决定的(表Ⅲ-31-2)。以甲硫氨酸为氨基末端残基的酵母蛋白,其典型的半衰期多于20分钟,而以精氨酸为氨基末端的半衰期仅约2分钟。使蛋白质高度不稳定的氨基末端残基,如精氨酸和天冬氨酸有利于蛋白质的迅速泛素化(ubiquitination);而使蛋白质稳定的残基,如甲硫氨酸和丝氨

表 Ⅲ-31-2 细胞液蛋白质的半衰期与其氨基末端残基的性质的关系

氨基末端残基	半衰期
起稳定作用的	
甲硫氨酸	>20 小时
甘氨酸	
丙氨酸	
丝氨酸	
苏氨酸	
缬氨酸	
起不稳定作用的	
异亮氨酸	~30 分钟
谷氨酸	
酪氨酸	~10 分钟
谷酰胺	
脯氨酸	~7 分钟
极度起不稳定作用的	
亮氨酸	~3 分钟
苯丙氨酸	
天冬氨酸	
赖氨酸	
精氨酸	
精氨酸	~2 分钟

来源: A. Bachmair et al. Science 234(1986):179.

氨基酸则否。在接合反应中,  $E_3$  酶可能是氨基末端残基的校读者。值得注意的是, 根据其是否使蛋白质稳定化、不稳定化和高度不稳定化而排列的氨基末端残基的次序, 在细菌、酵母和哺乳动物中都是类似的。决定着蛋白质的半衰期的这种信号在进化过程中已经保留了几十亿年。控制着蛋白质降解的其他信号仍亟待阐明。

## 概 要

蛋白质含有决定着其最终去向的信号。所有蛋白质(由线粒体和叶绿体 DNA 编码的除外)的合成均开始于细胞液中游离的核糖体上。在真核生物中, 蛋白质合成在细胞液中继续进行, 但若新生的链含有一疏水的信号顺序, 则该顺序指令核糖体趋向内质网(ER)。信号识别颗粒(SRP)是核糖核蛋白的组装体, 它识别信号顺序, 并将带有此顺序的核糖体引到 ER。然后新生的链被 ATP 所推动的原动力转运, 通过 ER 膜。转运和链的延长是在机械上分开的过程, 但它们常常同时发生。转运继续进行, 直到遇上终止转运的顺序为止。多个信号顺序和终止转运信号使得蛋白质在双分子层中穿来穿去。转运后大部分信号顺序均被切去。细菌的信号顺序与真核生物的相似。把细菌的信号顺序放在胞液蛋白的氨基末端, 确实可以指令该蛋白质趋向 ER。

糖蛋白从多萜醇焦磷酸供体获得其 N-连接的糖的核心。14 个糖残基的一块, 从这一高度疏水的载体上被运至天冬酰胺侧链上。当糖蛋白仍在 ER 中时, 3 个葡萄糖残基和 1 个甘露糖残基就迅速被修饰了。转移囊泡把蛋白质从 ER 带到高尔基体, 以便对糖单位作进一步的修饰, 并进行分拣。高尔基体由一叠膜所形成的囊组成, 这些囊又分化为顺、中和反的部分。顺部分离 ER 最近, 并从 ER 接受囊泡。另一组囊泡把蛋白质从高尔基体的顺部分传递到中部分, 再传递到反部分。糖蛋白中的糖单位在这些部分中一一发生修饰。以溶酶体为目的地的酶有一种构象特点, 此特点导致甘露糖-6-磷酸的加入。这种磷酸化的糖为结合在膜上的一种受体所识别, 此受体将糖蛋白带到溶酶体中。分拣主要发生在反高尔基体及由它而衍生的囊泡中。

线粒体中的大部分蛋白质是由核 DNA 编码, 并由细胞液中的游离核糖体合成的。它们含有的氨基末端顺序称为线粒体的前顺序, 此顺序指令它们被运入线粒体, 并特定它们究竟是留在外膜中, 还是继续被运至内膜、膜间空间或衬质中。到达外膜以外各部位的转运, 是由跨内膜的质子电力推动的。把线粒体的前顺序接在细胞液中的蛋白质上, 就可指令该蛋白质被运至线粒体衬质中。叶绿体也要输入其中的大部分蛋白质, 并根据其前顺序(亦称转运顺序)的性质而将它们送往 6 个部位。叶绿体蛋白质向其内部的输入, 是由 ATP 的水解推动的。线粒体和叶绿体的前顺序, 大多在输入之后就被切去了。有一不同系列的信号把蛋白质送至细胞核中, 这些信号使蛋白质能跨过核孔。

特殊的蛋白质是通过以受体为媒介的胞吞作用而输入真核细胞的。结合在跨膜受体上的蛋白质聚集在质膜的有壳小孔区域内。笼形蛋白参与胞吞作用, 它围绕着有壳小孔形成多面体的晶格。所形成的有壳囊泡, 由于不形成壳的 ATP 酶的作用, 迅速失去其笼形蛋白外壳。于是, 此囊泡变成为内小体(受体小体)。内小体的酸度(pH5 至 6)引起大多数蛋白质-受体复合物的解离, 并导致其分拣。许多病毒和毒素通过以受体为媒介的胞吞作用而进入细胞。酸诱导的构象变化使得它们能从内小体中释放到细胞液中。

蛋白质也会被运去被破坏。泛素是存在于所有真核细胞中, 并在进化过程中十分保守的蛋

白质。它会与被运去进行降解的蛋白质发生共价连结。泛素的羧基末端与蛋白质的  $\epsilon$ -氨基的接合包括 ATP 的活化作用和对一种标志的识别。细胞液中的蛋白质被泛素化的速率在很大程度上决定于其氨基末端。例如,甲硫氨酸就导致长的半衰期,而精氨酸则导致非常短的半衰期。

## 第 32 章 原核生物中基因表达的控制

细菌是极其多种多样和反应性极强的生物,因为它们能感知许多种代谢物的水平,并借助于许多极不相同的机理相应地调节其代谢类型。正如在以前几章中已讨论过的,许多种关键性蛋白质的活性是由变构作用和可逆的共价修饰所控制的。在决定细胞过程的类型方面同样起关键作用的是基因表达的控制。一个大肠杆菌细胞仅含有 10 个左右拷贝的稀有蛋白质,但却有多达  $10^5$  个拷贝的极丰富的蛋白质。其次,某些蛋白质的合成速率可相差 1000 倍之多,快慢决定于其对养分供应或环境挑战的反应。

基因活性基本上是在转录水平上被调节。在细菌中,许多基因聚集在称为操纵子的单位中。一个操纵子中基因的协调的转录为阻遏蛋白所阻断,而为促进性蛋白所活化。我们将集中注意力于大肠杆菌中的乳糖操纵子和色氨酸操纵子,因为关于它们的控制的分子基础知道得很多。噬菌体  $\lambda$  是另一种值得研究的对象,因为它说明了在不同的途径间如何作出选择。几种起控制作用的蛋白质三维结构的阐明揭示出在蛋白质-DNA 相互作用中,有重复出现的特点。关于原核生物中基因表达调节的成功的研究激起了关于更为复杂的真核系统的研究,这是下一章的主题。

### 可诱导的分解代谢的操纵子是由含有结合态环 AMP 的 CAP 蛋白从总体上调节的

(上略)CAP(catabolic gene activator protein,分解代谢基因活化剂蛋白)能促进 *lac* mRNA 合成的起始加快 50 倍。怎样促进呢?CAP 和 RNA 聚合酶的结合部位的相邻近、而又不互相重叠的排列说明:CAP 结合到 DNA 上给 RNA 聚合酶创造了一个额外的相互作用部位。事实上, RNA 聚合酶与结合态 CAP 的在热力学上有利的接触促进了它与启动子的结合。反之, *lac* 阻遏物与核苷酸 -3 至 +21 结合,这些核苷酸与 RNA 聚合酶的部位有许多重叠。因此,阻遏物在空间上干扰 RNA 聚合酶的结合。

cAMP-CAP 复合物对其它可诱导的分解代谢操纵子的作用大概也类似。所有这些操纵子都含有启动子部位上游的 TGTGA 顺序。另一共同特点,就是它们的 -35 和 -10 顺序与强启动子的一致顺序有显著的不同。进化过程大概使这些启动子变弱了,于是它们的操纵子还依赖于一种起帮助作用的蛋白质,所以控制更有效。高水平的表达需要 cAMP 和一种专一的诱导物同时存在,例如半乳糖苷就是 *lac* 操纵子的诱导物。专一的诱导物仅作用于一种操纵子,而 cAMP-CAP 复合物则影响许多种操纵子。

cAMP 所协调控制的操纵子是总体调节系统(global regulatory circuit)的一个成员。另一个这样的系统是由热休克基因组成的,这种基因为 RNA 聚合酶的明确的西格玛亚基所活化,而这种亚基则由温度的升高所诱导。还有一个总体控制的例子,即 SOS 基因的诱导,修复破坏的 DNA 的酶由此基因编码。这些高水平的调节系统中的每一个都是被特定的因素引发的,并且其本身就有使自己回复到未活化状态的机理。

## 同一种蛋白质的不同形式活化和抑制阿拉伯糖操纵子的转录

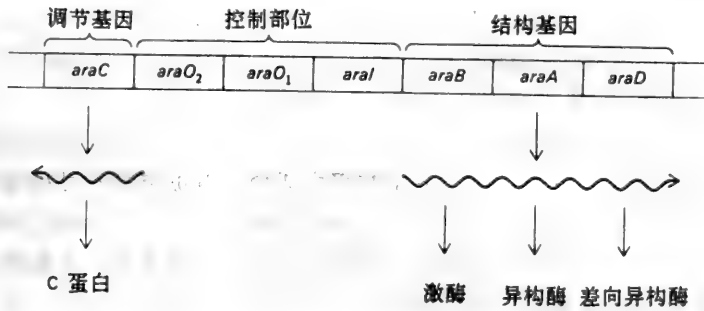


图 Ⅲ-32-13 阿拉伯糖操纵子及其调节基因图。

阿拉伯糖操纵子,像其他可诱导的分解代谢的操纵子一样,受到双重控制。有效的转录需要两个信号——cAMP-CAP 复合物和结合在 C 蛋白上的阿拉伯糖。这种操纵子的明显特点就是 C 蛋白也起负调节剂的作用。*araC* 的转录方向与 *araBAD* 的相反,并且为  $O_1$ 、而不是  $O_2$  操纵子部位所控制。当 C 蛋白和 cAMP-CAP 的水平低时,则形成 C 蛋白(图 Ⅲ-32-14A)。

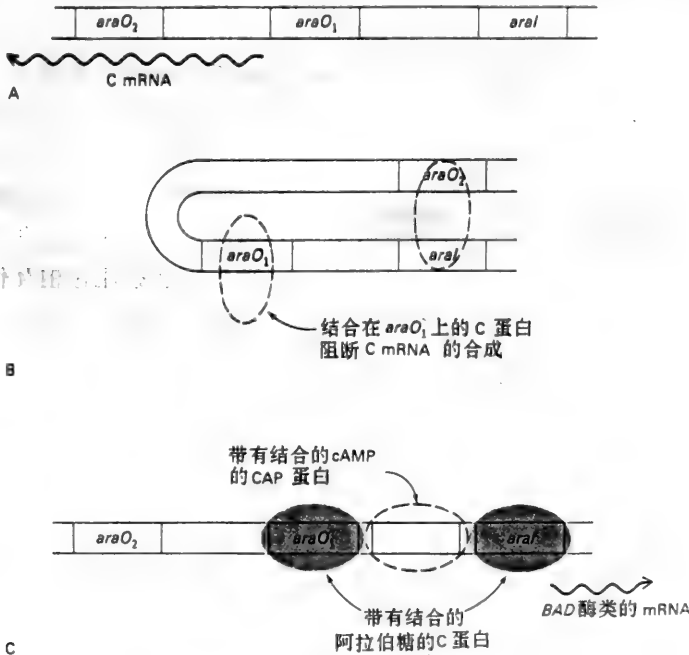


图 Ⅲ-32-14 阿拉伯糖操纵子的三个状态。

- (A) 当 C 蛋白水平低时形成 C 蛋白的 mRNA。
- (B) 当 cAMP 水平低而 C 蛋白丰富时,不管阿拉伯糖的水平如何,均无 mRNA 形成。
- (C) 当 cAMP 和阿拉伯糖均丰富时,即形成阿拉伯糖分解代谢的酶的 mRNA。

当 C 蛋白多而 cAMP-CAP 不多时, C 基因的转录停止,因为 C 蛋白与 *araO1* 结合。因此, C 蛋

白的合成是自我调节的。第二个 C 蛋白分子与 *araO*<sub>2</sub> 的结合通过形成 DNA 的一个环，而阻断 BAD mRNA 的合成；还有 C 蛋白与 *araI* 的结合也阻断此 mRNA 的合成，*araI* 是与 BAD 基因的启动子相邻的（图 III-32-14B）。当 cAMP-CAP 多时和阿拉伯糖与 C 蛋白结合（此结合改变 C 蛋白的构象）时，也不形成这种 DNA 的环。这些正调节因子的存在使得 RNA 聚合酶与 BAD 基因的启动子部位结合，并将此基因复制（图 III-32-14C）。在这种情况下，不会形成 C 蛋白的 mRNA，因为 *araO*<sub>1</sub> 为 C 蛋白所占据。

阿拉伯糖操纵子说明了基因调节的几条一般原理。第一，蛋白质能够通过其自身基因的转录而调节其自身的合成。第二，信号分子与蛋白质的结合能够使它从转录的抑制剂变为转录的活化剂。这些不同的构象与 DNA 上不同的调节部位结合。第三，DNA 上与蛋白质结合的调节部位并不需要邻近它们所控制的基因。阿拉伯糖操纵子提供了一个具体例子，说明转录如何能被一个与所转录的基因有一些距离的部位所调节。第四，信号分子所引起的变化极易逆转。这种系统对代谢物水平的变化连续不断地和迅速地发生反应。

### λ 阻遏蛋白的水解和 cro 蛋白的合成终止溶原作用

上述反馈回路将趋向于维持阻遏物的水平，以至于余下的噬菌体基因组不被表达。那么，噬菌体又怎样从溶原作用产生呢？关键性的变化是减少 λ 阻遏物的分子，使它刚好足够使 *cro* 基因被转录。然后已完全形成的 *cro* 蛋白质（也作 Cro，7kd 亚基的二聚体）与 *O*<sub>R</sub>3 结合，以阻止 *cl* 基因的转录（图 III-32-22）。要点在于 *O*<sub>R</sub>3 对 *cro* 蛋白的亲合力比对 *O*<sub>R</sub>1 的高。这样，低水平的 *cro* 蛋白阻遏 λ 阻遏物的合成，而不必使 *cro* 蛋白本身的合成停止。现在 λ 阻遏蛋白就不能再得到 *O*<sub>R</sub>3。此时就会发生一连串事件，导致溶原作用不可逆地进行下去。

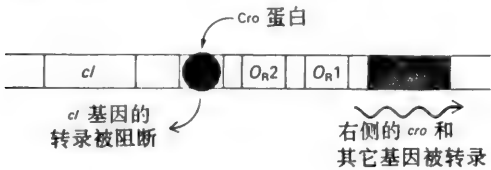


图 III-32-22 低水平的 Cro 蛋白由于首先与 *O*<sub>R</sub>3 结合而阻断了 *cl* 的表达。由于部位 *O*<sub>R</sub>1 是空的，所以 Cro 的 mRNA 形成了。

由于紫外光照射或化学药剂而引起 DNA 的伤害，会引起溶原作用转变为溶原作用。这些事件之间有什么联系呢？关键性的步骤是细菌的 *recA* 蛋白使 λ 阻遏蛋白发生水解而被破坏。回忆一下，*recA* 蛋白催化一般重组作用中 DNA 链的交换。当 *recA* 蛋白与单链 DNA 结合时，它也是蛋白酶，这种结合是 DNA 已被破坏的信号。

在活化 SOS 反应方面这种蛋白酶活性是重要的，SOS 的反应导致 15 种以上蛋白质的合成，这些蛋白质参与 DNA 的修复。活化的 *recA* 蛋白降解 *lexA* 阻遏蛋白，这种蛋白与 SOS 基因的操纵基因结合而抑制其转录。噬菌体 λ 利用这种引发的蛋白酶活性转变到它的溶原作用方式，于是它就可以逃避那个不再安全的场所。λ 的这种巧妙的行为来自于仅仅少数几种蛋白质和操纵基因部位的令人注目的相互作用。其调节系统的井然有序和精致优美，实为惊人。



## 螺旋-转角-螺旋的特点调节着许多种调节蛋白与 DNA 中控制部位的结合

阻遏物和活化剂如何与 DNA 结合, 并识别其靶子顺序呢? 马修斯 (B. Matthews) 及其同事关于 *cro* 蛋白 (Cro) 三维结构的阐明直接提出它是如何起作用的。由 66 个残基组成的单体含有 3 个  $\alpha$ -螺旋和 3 个反向平行的  $\beta$ -片。二聚体则由 2 个反向平行的片的联合而固定在一起, 双重对称轴在它们之间。一个亚基中的螺旋 3 与另一个亚基中的螺旋 3 相距  $34\text{\AA}$ , 和沃森-克里克双螺旋中相邻的主槽之间的距离相同。其次, 一个  $\alpha$ -螺旋(包括其侧链)的直径约为  $12\text{\AA}$ , 其大小恰好放在 DNA 的主槽中, 此主槽宽约  $12\text{\AA}$ 、深约  $7\text{\AA}$ 。另一重要的结构特点是, Cro 的双重对称性与它所识别的操纵基因部位的 17 个碱基对的近似对称性相互配合。这样, 十分可能的是, Cro 把它的每一亚基的第三个螺旋放到 DNA 的相邻的主槽之内(图 III-32-25)。此螺旋的暴露的侧链与主槽中碱基对的暴露部分之间氢键的形成则产生专一性。例如, 谷酰胺侧链可与腺嘌呤形成 2 个氢键。互补的 DNA 与蛋白质表面之间的范德瓦尔斯力也对专一性有贡献。一个  $\alpha$ -螺旋的大小和形状恰好适于直接与主槽中的 5 个碱基对相互作用, 这足以确定 Cro 与其它结合 DNA 的蛋白质的专一性。对于突变体操纵基因的分析 and 对于用遗传工程方法产生的、不能形成牢固的 Cro-DNA 复合物的各种变异的 Cro 的分析, 均支持上述意见。

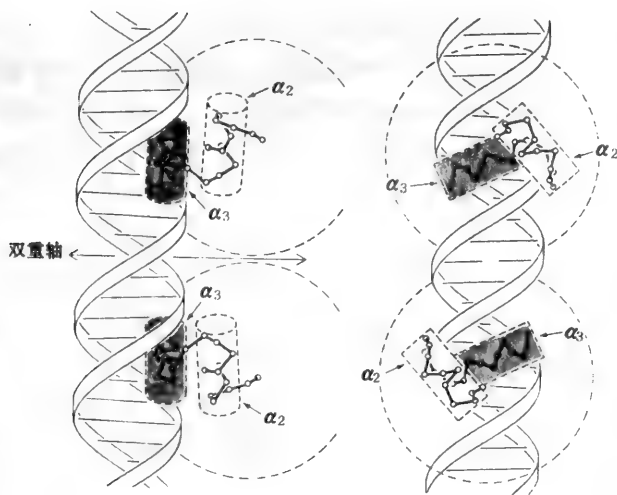


图 III-32-25 Cro 蛋白与 DNA 相互作用的两面观。

Cro 二聚体的一对相互对称的  $\alpha$ -螺旋整齐地放在 DNA 的相邻的主槽中。

许多其它种与 DNA 结合的蛋白质也有 2 个  $\alpha$ -螺旋式的识别单位, 它们之间的关系也是有一双重的对称轴, 并相距  $34\text{\AA}$ , 即 DNA 中的螺距。比较 Cro、 $\lambda$  阻遏蛋白的与 DNA 结合的结构域和 CAP 蛋白的结构即可看出, 这些蛋白质和其它与 DNA 的专一部位结合的蛋白质有一共同特点, 即螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix) 的特点。第一个螺旋 (识别螺旋) 含有能与 DNA 主槽中的碱基对相互作用的侧链; 第二个螺旋则与 DNA 发生疏水的相互作用, 而使此特点稳定。

## 改变其识别螺旋，可改变阻遏蛋白的专一性

最近解决了阻遏物-操纵基因复合物的三维结构问题。噬菌体 434 是与  $\lambda$  极为相近的噬菌体，它也表现螺旋-转角-螺旋的特点。而且，如所预期，它的识别螺旋也在 DNA 的主槽内，DNA 则呈 B-DNA 的形式。阻遏物和其它调节性蛋白大概是通过与 B-DNA 结合，并筛选其主槽而寻找靶子顺序。大多数调节蛋白能识别 B-DNA 或稍有不同的 DNA，因为在寻找专一的靶子顺序时它们能够沿着 DNA 而滑动。不能与 B-DNA 结合的蛋白质要进行这种寻找就慢得多。

仅仅改变阻遏物的识别螺旋，能够改变其专一性吗？将 434 阻遏物中此螺旋外面的 5 个氨基酸残基换成 P22 阻遏物中占据同样位置的 5 个残基，P22 阻遏物是由感染沙门氏菌的噬菌体所编码的。体内和体外的测定均证明，这种更换螺旋的实验把嵌合蛋白的专一性改变成了 P22 阻遏物的专一性。因此，阻遏物的识别螺旋外面的残基决定着其与 DNA 结合的专一性。知道这一点将是有趣的，即在识别螺旋的氨基酸残基与靶子部位的碱基顺序的关系中，是否有点什么规则——识别密码。

## 游离的核糖体蛋白阻遏为其编码的 mRNA 的翻译

50 种以上的核糖体蛋白的合成是如何协调起来的呢？它们的基因位于 20 个以上的操纵子中，然而它们的合成却是极为平衡的。严密的控制是必需的，因为核糖体蛋白约占细菌细胞干重的 10%。核糖体蛋白合成的控制基本上在翻译水平上，而不在转录水平上，这是与大多数其它蛋白质不同的。至少有一种操纵子编码的核糖体蛋白的操纵子编码的蛋白质起着翻译阻遏物的作用。它与 mRNA 结合，此 mRNA 靠近其自身合成的起始位点，于是它阻断由此多基因信使所编码的几种蛋白质的合成。与 mRNA 的这种结合并不干扰核糖体的组装，因为核糖体蛋白与核糖体 RNA 的结合要比与 mRNA 的结合牢固得多。只有当核糖体蛋白的产生超过了核糖体 RNA 的产生时，或当这些蛋白质的形成不成等分子比时，才发生翻译的阻遏。

核糖体 RNA 类与转移 RNA 类的合成并不与其他蛋白质的合成相协调。当氨基酸很少时，这些 RNA 的合成也停止。这种对于不利条件的适应称为严紧型反应 (stringent response)，是由一种不寻常的核苷酸转达的。这种核苷酸原名魔斑点 (magic spot)，因为它神秘地出现于某些细胞提取物的色谱上。这种在氨基酸缺乏的条件下形成的新化合物原来是鸟苷四磷酸 (ppGpp)。它是由 ATP 上的二磷酸单位转移到 GDP 的 3'-OH 上而形成的。这一反应要求位于核糖体 A 部位上的不带氨酰基的 tRNA 和一种称为严紧因子 (stringent factor) 的蛋白质，此蛋白质与核糖体结合。只有在缺乏氨基酸的细胞中才形成 ppGpp，因为只有当相应的氨酰基不存在时，A 部位才会被不带氨酰基的 tRNA 所占据。一旦形成了，ppGpp 就会抑制为核糖体 RNA 编码的操纵子转录的起始，并使许多其它转录本的延长变慢。ppGpp 的精确的作用机理实为引人入胜的问题。

## DNA 的倒位导致一对鞭毛基因的另一表达

沙门氏菌是生活在哺乳动物肠内的细菌，它靠从其表面上伸出的鞭毛的旋转而运动。鞭毛是细的螺旋状的蛋白质丝，由许多个 53kd 的鞭毛蛋白亚基组成。沙门氏菌含有鞭毛蛋白的 2 个基因，并且一次只表达其中的一个。平均每千次分裂之后，所表达的基因自动变换。这种在鞭毛蛋白 H1 和 H2 之间反复的变换称为阶段转变 (phase variation)。它有助于细菌躲避其寄主的免疫反应。要有效，变化就必须完全。例如，在阶段 2 中，只要在鞭毛中的许多个 H2 中即使有少数几个 H1 就会使得这种活动的附属物易于受到抗体的钝化作用，而抗体是以 H1 为对象的，是在阶段 1 产生的类型。这种反复的变化必须是绝对的和可逆的。

借助于反复利用两个基因中的一个这种灵巧而又简单的方法，达到了这两个目的 (图 32-39)。H2 的 mRNA 也就是使 H1 基因不活动的阻遏物的模板。这一发现解释了阶段 2，但是 H1 又如何能够排斥 H2 而独自得到表达呢？在阶段 1 中，H2 的启动子和阻遏物均无效，因为含有它的 DNA 片段被倒位了。在这一阶段中，启动子在错误的地方，并且也把 H2 基因和阻遏蛋白基因的表达指向了错误的方向。含有其自身的启动子的 H1 基因现在就可被表达了，因为其阻遏物不存在。

图 32-39 沙门氏菌 (Salmonella) 中的阶段转变

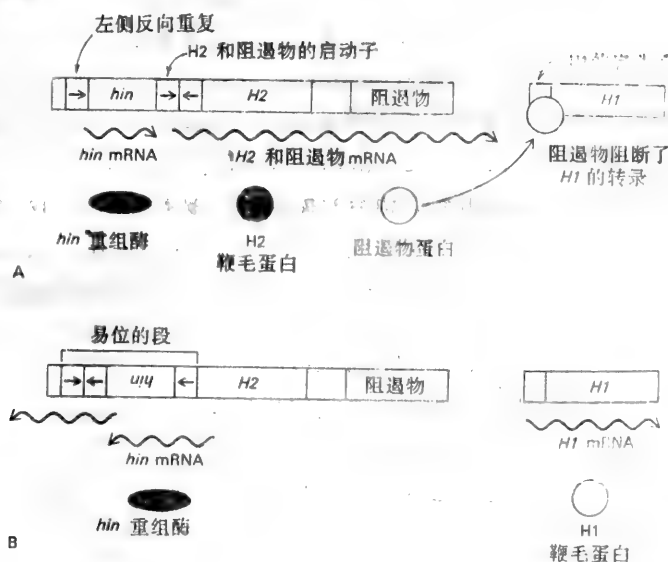


图 32-39 沙门氏菌 (Salmonella) 中的阶段转变，鞭毛蛋白 H1 和 H2 以相互排斥的方式表达。

(A) 阶段 2 中，由于与 H2 蛋白一道形成的阻遏物而使 H1 基因失去活性。

(B) 阶段 1 中，重组酶 (Hin) 催化 DNA 片段的倒位，导致 H2 的启动子和阻遏物的丧失，*hin* 是由此 DNA 片段编码的。然后 H1 基因被表达。进一步的多次倒位使得这一系统在这两个阶段之间反复变化。

是什么控制着那段带有 H2 的启动子和阻遏物的 DNA 的倒位呢？这一 970bp 片段的两端是一对 16bp 的反向末端重复顺序；它的中间编码一种称为 Hin 的重组酶，Hin 催化重复顺序

的重组。回想一下，方向相反的部位的重组导致位于它们之间的 DNA 片段的倒位。因此，4 个基因，即 H1、H2、阻遏蛋白和 Hin 的基因，组成了一种交互变换的系统（flip-flop circuit），它变换着暴露在外面的细菌蛋白质，变换频率则因重组酶活性而定。真核生物也利用基因的重排来调节它们的表达，下章将要讨论到。

## 概 要

原核生物以各种各样的方式调节所合成的蛋白质的量。大多数基因表达的调节主要在转录水平上。许多基因都是组成操纵子。一个操纵子由一个控制部位（操纵基因和启动子）和一组结构基因组成。还有调节基因编码一些与操纵基因和启动子相互作用的蛋白质，其作用是促进或抑制转录。

环式 AMP 是一种饥饿信号，它通过与分解代谢物基因活化剂蛋白（CAP）结合而促进许多分解代谢操纵子的转录。cAMP-CAP 与这些可被诱导的分解代谢操纵子的启动子区域中专一部位的结合就会促进 RNA 聚合酶的结合和转录的开始。lac 操纵子的充分表达要求半乳糖苷诱导物和 cAMP，当葡萄糖少时就会形成 cAMP。一种控制性蛋白的不同形式会活化或抑制阿拉伯糖操纵子的转录。

转录的阻遏物和激活剂决定着  $\lambda$  噬菌体究竟是走溶原途径还是溶菌途径。 $\lambda$  阻遏物阻止所有病毒基因的表达，但有一个基因（*ci*）例外，此基因编码阻遏物本身。阻遏物的表达是自我调节的；高浓度阻断 *ci* 的转录。寄主 DNA 的破坏导致 recA 蛋白的蛋白酶活性的提高，这又会降解  $\lambda$  阻遏物以及 *lexA* 阻遏物（DNA 修复的 SOS 基因的控制者）。cro 蛋白的随后表达使得  $\lambda$  阻遏物的继续形成停止并使病毒走上溶菌途径。溶原途径和溶菌途径之间的开关是以下列相互作用为媒介的，这就是  $\lambda$  阻遏物和 cro 蛋白与病毒 DNA 的  $O_R$  和  $O_L$  操纵基因部位中的 6 个结合部位之间的相互作用。

（中略）在核糖体的蛋白质合成的调节中，纯粹的翻译的控制是明显的。游离的核糖体蛋白质与起始部位结合，从而阻遏编码它们的 mRNA 的翻译。核糖体 RNA 的合成成为 ppGpp 所抑制，ppGpp 是当氨基酸少时所形成的信号分子。

沙门氏杆菌利用一种特化的控制基因表达的机理以一种相互排斥的方式使或是 H1 或是 H2 鞭毛蛋白得到表达。这种可逆的开关是以一 DNA 片段的倒位为媒介的，这个片段含有 H2 的启动子和催化此倒位的重组酶的基因。

第 33 章 真核的染色体和基因表达

真核的染色体含有一单个线状的 DNA 双螺旋分子

(上略)。

表 Ⅲ-33-1 几种原核的和真核的基因组的 DNA 含量

生 物	碱 基 对 数	DNA 长度 (mm)	染色体数
大肠杆菌 ( <i>E. Coli</i> )	$4 \times 10^6$	1.4	1
酵母( <i>S. cerevisiae</i> )	$1.4 \times 10^7$	4.6	16
黑腹果蝇( <i>D. melanogaster</i> )	$1.7 \times 10^8$	56	4
人	$3.9 \times 10^9$	990	23

注：所列数字是单倍基因组的。

染色体两端(端粒)由添加已形成的整段寡核苷酸而复制

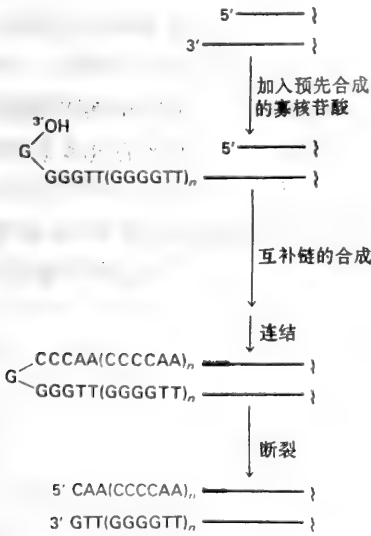


图 Ⅲ-33-17 线状双螺旋 DNA 复制的完成。

真核的染色体的线性提出了一个在环状 DNA 方面没有遇到过的问题,例如原核的 DNA 就是环状的。真核生物的 DNA 聚合酶也和原核生物的一样,不能以 3'→5' 的方向进行合成或开始新链的合成,因此去掉 RNA 引物后留下的新生的 DNA 子链的 5' 端是不完全的(图 Ⅲ-33-17)。5' 端是怎样完成的呢?首先,预先已合成的整段寡核苷酸被加到新合成的子链的空悬的 3' 端上。在纤毛原生动动物四膜虫(*Tetrahymena*)中,大约有 50 个拷贝的 5'-TTGGGG-3' 被加到每一个 3'-OH 端上。这些延长的部分然后绕成环,于是它们的 3'-OH 就起着引物的作用,引起互补的 3'-AACCCC-5' 顺序的合成。DNA 连结酶把这些 3' 的延长部分一一连结到 5' 端上,而且核酸酶将未成对的环切掉,形成一线状的齐头的双螺旋。因此,四膜虫是通过把双螺旋的两条链的每一端瞬时连结起来而完成其线状染色体的复制。

## 线粒体和叶绿体含有其自身的 DNA

(上略)人的线粒体 DNA 为双螺旋的环,含有 16,569 个碱基对,其顺序已完全被测定。此基因组编码 12 种 tRNA 和 2 种 rRNA。此 DNA 编码蛋白质能力的约 60% 用于指定 NADH-Q 还原酶的 7 种亚基,此还原酶是线粒体内膜中 3 个泵动质子的复合物中的第一个。这一 DNA 分子也编码细胞色素还原酶的亚基、3 个细胞色素氧化酶的亚基和 2 个 ATP 合酶的亚基。人线粒体基因组的一个显著特点就是它的利用极端经济。人线粒体 DNA 中几乎每一个碱基对都编码一种蛋白质或 RNA 产品,有些甚至负有双重责任,即一个基因的最后的碱基又是下一个基因的第一个碱基。H 链(DNA 双股链中较密的一股)编码所有的 RNA 和蛋白质产物,只有一种蛋白质除外,它和 14 种 tRNA 是由 L 链编码的。从 H 链产生一单个的原初转录本,从 L 链产生另一个转录本。这些转录本在 tRNA 顺序的两头被切断。

人线粒体中基因表达的另一显著特点是仅仅使用 22 种 tRNA,而细胞液中则用 61 种。有些线粒体 tRNA 可破读 4 种密码子。如前面一章(第 5 章)所述,线粒体有其独特的遗传密码。4 个密码子的意义不合标准:AGA 和 AGG 通常是编码精氨酸,在此则为终止密码;AUA 编码甲硫氨酸,而非异亮氨酸;UGA 编码色氨酸,而非终止信号。

## 人的基因组含有差不多一百万个拷贝的 极为相似的 ALU 顺序

所有的高等真核生物确实有大量重复的 DNA。例如,人的 DNA 中有 30% 以上是由至少重复 20 次的顺序组成的。Alu 顺序特别多。Alu 顺序是指许多种类似的顺序,其中有一个限制性核酸内切酶 Alu I 的靶子部位,因而得名。这些 300 个 bp 的顺序在人的基因组中重复出现近百万次,因此占 DNA 的 7% 左右。Alu 顺序分散在整个基因组中;人 DNA 的大多数 20kb 的片段均含有一 Alu 顺序。这一组顺序中任何两个之间共同的程度约为 85%。一项引人注目的发现是 Alu 顺序与 7SL RNA 的顺序相似,这是信号识别颗粒中的小的细胞质 RNA 分子。回想一下,这种组装体在把膜蛋白和分泌性蛋白传递到内质网以进行转运方面起着关键性作用。Alu 顺序的起源可能是 7SL RNA 的反转录,随后此 cDNA 被整合到基因组中。

## 着丝粒含有重复极多的 DNA,可将它与 其它染色体 DNA 分开

许多高度重复的 DNA 可用密度梯度离心法分离出来,因为它们具有特别的浮力密度。例如,已分成碎片的果蝇(*Drosophila virilis*)的 DNA 的沉降图谱表明,有一主带和 3 个较轻的卫星带,每条卫星带仅由一种高度重复的 DNA 组成。事实上,每一条带中的 DNA 是一种七核苷酸顺序:

5'—ACAAACT—3'	5'—ATAAACT—3'	5'—ACAAATT—3'
3'—TGTTTGA—5'	3'—TATTTGA—5'	3'—TGTTTAA—5'
卫星 I	卫星 II	卫星 III

这种卫星 DNA 部分在染色体中的定位已有原位杂交法测定,这种技术是由哥尔(J. Gall)和帕丢(M. L. Pardue)设计的。先将细胞固定在一薄层琼脂之下,再用碱使 DNA 变性。将此制品与氘标记的 RNA 一同保温,此 RNA 是在体外从纯化的小鼠卫星 DNA 转录的。用放射自显影鉴定这种杂交的 DNA,这是由放射性 RNA 与含有卫星 DNA 的染色体区域相杂交而得到的。得到了非常明确的结果:小鼠的卫星 DNA 仅限制在着丝粒区域(在有丝分裂中,子 DNA 分子彼此相连,并且连在有丝分裂的纺锤体中一特化的染色体部位上,此部位称为着丝粒)。这些卫星顺序(亦称为简单顺序的 DNA)不编码蛋白质。它们大概是在有丝分裂和无丝分裂中帮助染色体排在一起。

## 核糖体 RNA 的基因以纵列方式重复数百次

为核糖体 RNA 分子编码的基因在两个方面有明显特点。第一,它们是纵列地重复的。几乎所有真核生物都有 100 个以上拷贝的这些基因。第二,大多数 rRNA 基因均位于染色体中特化的区域,这些区域与核仁相连。缺乏核仁的突变体合成极少的 rRNA,并因而不能活下去。关于这些基因知道得很多,主要是由于毕尔恩斯蒂尔(M. Birnstiel)、布朗(D. Brown)、密勒(O. Miller)和他们的同事的工作。4 种核糖体 RNA,即 18S、5.8S、28S 和 5S rRNA 的基因已从非洲爪蟾(*Xenopus laevis* 和 *Xenopus mulleri*)的 DNA 中提纯。之所以选用这类生物,是因为它们的卵母细胞中这些基因的量特别大。

18S、5.8S 和 28S rRNA 的基因聚成一簇,并且以纵列方式重复。原位杂交研究表明,这些基因位于核仁中。重复出现的它们所形成的簇是由间隔区(spacer)隔开的,间隔区不被转录。蟾的体细胞含有约 500 个拷贝的这些重复单位,均成纵列排成簇。在卵母细胞发生过程中,这些基因有选择地复制数千次,形成约  $2 \times 10^6$  个拷贝。事实上,这些 rRNA 分子的基因组成了卵母细胞全部 DNA 的将近 75%。扩增的 DNA 以染色体外的环状而存在,这些环结合在许许多多新的核仁上。这种选择性的基因扩增,使得卵母细胞能够聚积  $10^{12}$  个核糖体,这是细胞分裂过程中所发生的非常迅速的蛋白质合成所必需的。没有基因的扩增,那会需要几个世纪来组装  $10^{12}$  个核糖体!

3 个 rRNA 基因的一个簇由核仁中的 RNA 聚合酶 I 转录,形成 45S RNA。这一初级转录本再由酶促作用进行修饰和切割,产生成熟的 18S、5.8S 和 28S 的 rRNA。约有 100 个核苷酸被甲基化,差不多都是在它们的核糖单位的 2'-羟基上。从酵母到果蝇距离这么远的真核生物的 rRNA 中,一直保留着这一高度专一的甲基化部位。此外,在前体 RNA 中有 100 个以上的尿核苷异构化为假尿苷。在成熟过程中许多核糖体蛋白变成与这些 RNA 及其前体联合在一起。RNA 与核糖体蛋白的相互作用确实能使某些部位变得对核酸酶的作用敏感。

卵母细胞和体细胞的核糖体还含有 5S rRNA 分子,这种分子在其 120 个核苷酸中有 8 个是不同的。一个爪蟾细胞含有 400 个拷贝体细胞类型的 5S 基因或 2000 个拷贝卵母细胞类型的 5S 基因。它们在大多数染色体的两端纵列地重复着。又是未被转录的间隔区把这些拷贝分开了。间隔区实际上比基因长好几倍。

## 组蛋白基因聚成簇，并且也纵列地重复多次

为蛋白质编码的基因是怎样排列着的呢？组蛋白基因是这些基因中第一个被分离并鉴定的，因为在迅速分裂的海胆胚中组蛋白的 mRNA 非常多。这种海生无脊椎动物在大约 10 小时内就从合子发育成为 1000 个细胞的囊胚，因此必须合成大量的组蛋白，以形成新的染色质。实际上，在胚胎发育早期所合成的蛋白质中，有 1/4 以上是组蛋白。而且，在此阶段所合成的信使 RNA 中约有 70% 是组蛋白的 mRNA，因此比较容易分离它们。然后测定组蛋白 mRNA 与海胆 DNA 杂交的动力学，以确定组氨酸基因的拷贝数。杂交的速率数百倍于单拷贝顺序所应有的速率，证明组蛋白基因是高度重复的。在几种海胆中，组蛋白基因的拷贝数在 300 至 1000 之间（表 III-33-5）。在其它生物中，此数目较小。例如，酵母中每种组蛋白基因只有两个拷贝。一种生物体内组蛋白基因的拷贝数与其对组蛋白 mRNA 迅速合成的需要相关。

表 III-33-5 组蛋白基因的重复频率

物 种	拷 贝 数
海胆	300—1000
果蝇 ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	110
爪蟾蜍 ( <i>Xenopus laevis</i> )	20—50
小鼠	10—20
鸡	10
人	30—40

海胆中 5 种主要的组蛋白的基因聚成基本上是 7kb 的重复单位。这些重复单位的 5 个编码区为 5 个间隔区所隔开。这样 5 个基因的一个组前后纵列地重复多次。重复情况非常相似但不相同，这与下列发现一致，即 H1、H2A 和 H2B 是极为相近的蛋白质的类群，而不是单独的 3 种蛋白质。在不同组织中和发育不同时期，不同簇的组蛋白基因被表达。在果蝇中 5 种组蛋白的基因也是聚成一簇，并纵列地重复。不过在某些脊椎动物中，组蛋白基因是分散的，说明聚集成簇并不是协调一致的基因表达所必需的。

组蛋白基因的表达，还有两个值得注意的特点。第一，组蛋白基因没有内含子。在脊椎动物中连续不断的基因是少有的。第二，组蛋白 mRNA 没有 poly A 的尾。没有内含子和 poly A 的尾可能使得组蛋白的 mRNA 能够极其迅速地形成并转运到细胞液中去。

## 许多主要的蛋白质是由单拷贝的基因编码的

我们已经看到核糖体 RNA 和组蛋白的基因都是重复许多次的。是否为众多产物编码的其它基因也有许许多多多个拷贝呢？布朗 (D. Brown) 在重组 DNA 技术被发明以前就研究了这个问题，他是从家蚕 (*Bombyx mori*) 中分离丝纤蛋白的 mRNA。之所以选择这一系统，是因为丝纤蛋白的 mRNA 有其独特的化学特性。它是富含甘氨酸的重复的氨基酸顺序的模板。其次，在蚕幼虫发育的特定阶段，一种类型的巨细胞就合成极大量的丝纤蛋白。根据丝纤蛋白



mRNA 的大小 (9.1kb) 和与 rRNA 和其它 RNA 分子相比的极高的 G 含量,可将其提纯。将纯化的丝纤蛋白的 mRNA 与基因组的 DNA 杂交证明了:每一单倍基因组中只有一个丝纤蛋白的基因。

关于真核生物的基因表达和分化,这项结果有重要的意义。它表明甚至只有一个拷贝的基因时,仍可合成大量的某种特定的蛋白质。丝纤蛋白的这一单个基因是合成  $10^4$  个 mRNA 分子的模板,这些 mRNA 分子可稳定数天不变。每一 mRNA 又是合成  $10^5$  个蛋白质的模板。因此,一单个基因就足以合成  $10^9$  个蛋白质分子。

核糖体 RNA 和组蛋白的多次重复的基因是例外的而不是普遍的情况。所发现的丝纤蛋白的单个基因到是典型得多,为蛋白质编码的基因,甚至为丰富的蛋白质编码的基因都是如此。例如,网织红细胞含有一个或少数几个拷贝的血红蛋白亚基的基因。同样,下蛋的母鸡的输卵管中要合成大量的卵清蛋白,即鸡蛋白中的主要蛋白质,但母鸡的单倍基因组中只有一个拷贝的这种基因。

### 在选择的压力下单拷贝基因可大量扩增

由于基因扩增和选择,单拷贝基因可高度重复。例如,二氢叶酸还原酶 (DHFR) 是合成脱氧胸苷酸的关键性酶,将含有数百个拷贝 DHFR 基因的细胞放在有氨甲蝶呤的溶液中。DHFR 基因自我复制的速率是每次分裂约  $10^{-3}$ 。氨甲蝶呤是 DHFR 的抑制剂,它选择含有多拷贝的这种基因的细胞。这样,一染色体区域就可能得到一纵列簇的 DHFR 的或其它基因。重复单位的典型大小为 1Mb,这比发生扩增的基因大得多。

基因扩增的发现突出地说明了基因组的动态特性。基因复制经常发生,而且可因选择的压力而使之稳定化。关于二氢叶酸还原酶的工作也影响了癌的化疗方案,因为它说明将细胞长期置于致死剂量以下的一种抑制剂之下,可以产生抗药性。

### 两组血红蛋白基因依其在发育过程中的表达顺序而排列

血红蛋白的研究对于我们了解蛋白质的结构和功能贡献很大(第7章)。同样,关于血红蛋白基因及其表达方式的研究也是深入认识真核基因的一般功能的源泉。例如, $\beta$ -球蛋白 mRNA 与  $\beta$ -珠蛋白基因的杂交的研究就导致了真核细胞的基因中插有内含子的发现。

如前所述,在发育过程中合成不同的血红蛋白:胚胎的血红蛋白之后是胎儿的血红蛋白,然后是成年的血红蛋白。这些血红蛋白中的每一种都是由两个  $\alpha$ -类型的和两个  $\beta$ -类型的链组成的。 $\alpha$ -类型的基因聚集在一个染色体上,而  $\beta$ -类型的基因在另一个上(图 III-33-33A)。在  $\alpha$  簇中,胚胎的  $\zeta$  链的基因在  $\alpha$  链的两个基因之前, $\alpha$  链是胎儿血红蛋白和成年血红蛋白的组分。在  $\beta$  簇中,胚胎的  $\epsilon$  链的基因之后是胎儿的  $\gamma$  链的两个基因,然后是成年的  $\delta$  和  $\beta$  链的基因。这样,人的珠蛋白基因的顺序与它们在发育过程中表达的次序是一致的。了解这些基因为什么按发育的顺序而聚集是有意义的。一种可能性是  $\zeta \rightarrow \alpha$  的转换和  $\epsilon \rightarrow \gamma \rightarrow \delta, \beta$  的转换依赖于这些基因的距离远近和排列顺序。

这些基因的连结也反映它们的进化历史。这些基因的 DNA 顺序之间的差别说明,大约 500 万年前,脊椎动物进化的早期,一种祖先的血红蛋白基因曾复制并歧化出  $\alpha$  和  $\beta$  珠蛋白的

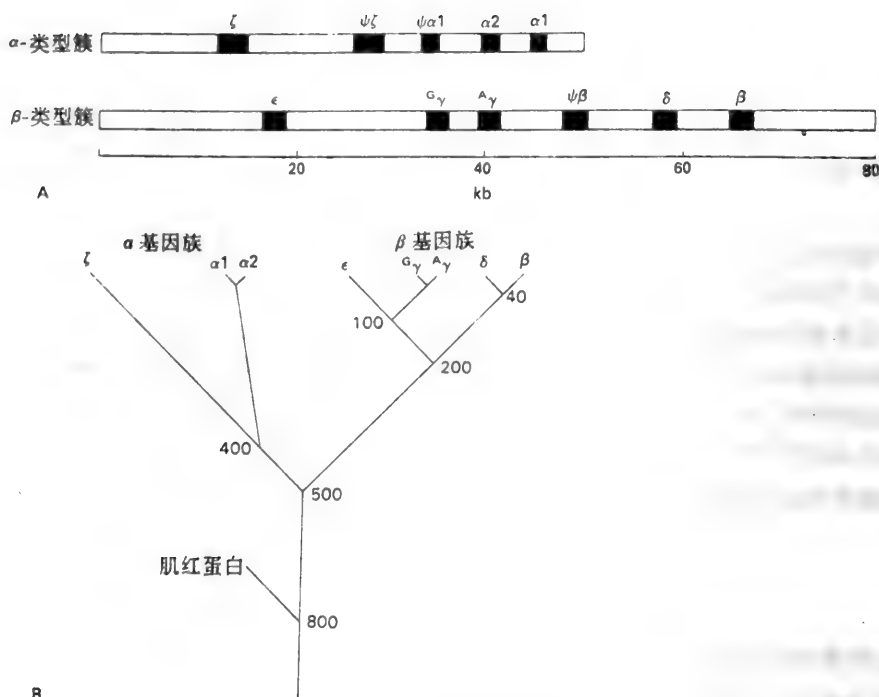


图 33-33 (A) 为人血红蛋白的  $\alpha$ -类型和  $\beta$ -类型链编码的基因簇的图。

胚胎的基因为  $\zeta$  和  $\epsilon$ ，胎儿的基因为  $\gamma_G$  和  $\gamma_A$ ，成年的基因为  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$  和  $\delta$ ，假基因均有  $\psi$  符号。基因之间的阴影部分为间隔区。这些基因中的每一个均由 3 个外显子和 2 个内含子组成（未画出）。(B) 由 DNA 和氨基酸顺序推导出来的珠蛋白基因的进化树。分支点处的数字是估计的歧化时间，百万年之前。[部分 B 据 A. J. Jeffreys, S. Harris, P. A. Barrie, D. Wood, A. Blanchetot, and S. M. Adams. In *Evolution from Molecules to Men*, D. S. Bendall, ed. (Cambridge University Press, 1983), p. 176.]

基因。肌红蛋白与血红蛋白的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基之间的差别比这两种亚基彼此之间的差别大，说明在  $\alpha$  和  $\beta$  基因出现之前，肌红蛋白就出现了。哺乳类、爬虫类、鸟类、两栖类和硬骨鱼类都有明确的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基，而原始的脊椎动物则只有一种血红蛋白亚基。后来  $\alpha$  和  $\beta$  基因复制并歧化出两个系列的基因，现在存在于人体中(图 33-33B)。根据 DNA 和蛋白质顺序推导出来的进化树是内容丰富的。正如 1965 年齐克坎德尔(E. Zuckerkandl)和鲍林(L. Pauling)提出的，生物大分子确实是进化历史的档案。

$\alpha$  和  $\beta$  基因簇均含有假基因。这些顺序与相连的基因同源，但它们不为功能性产物编码。字头  $\psi$  表示假基因，例如， $\psi\alpha_1$  就是一个类似于  $\alpha_1$  基因的假基因。这种假基因的有几个结构特点是它没有活性的理由：(1) 它没有剪接所需的 5' 端的合适的顺序；(2) 多腺苷酰化信号由 AATAAA 突变为 AATGAA；(3) 正常的 ATG 起始密码子为 GTG 所代替；(4) 从氨基酸残基 38 开始的 20 个核苷酸的缺失产生了 3 个终止密码子，它们阻碍着多肽链的完成。为什么会有假基因存在？它们中的大多数是由复制所产生，并在顺序上发生了漂移，因而失去了活性的基因的复本。我们看到了真核生物基因组中既有强有力的，也有失去作用的。

## 哺乳类的基因组中只有一小部分为蛋白质编码

表 II-33-6 真核 DNA 的类别

### 为蛋白质编码的基因

单拷贝基因

多倍的基因

### 为 RNA 编码的基因

大多为纵列多倍的

### 假基因

### 重复的 DNA

简单顺序 DNA (如卫星 DNA 中的)

分散的重复的 DNA (包括活动的遗传因素)

### 功能不明的间隔物 DNA

据 J. Darnell, H. Lodish and D. Baltimore.

*Molecular Cell Biology* (Scientific American

Books, 1986), p. 408.

$\alpha$  和  $\beta$  基因簇中起作用的珠蛋白基因彼此离得很远。这两个簇占据 35 和 60kb, 这相当于每个基因 12kb 左右, 但是为一个约 150 个残基的珠蛋白链编码所需要的 DNA 量仅为 0.45kb。因此, 这些基因簇中只有不到 4% 是编码蛋白质的。其次, 珠蛋白基因距最近的为蛋白质编码的基因都很远。也许哺乳类 DNA 中只有 2% 是真正为蛋白质编码的。因此, 哺乳类的 DNA 与细菌的 DNA 有显著的不同, 后者非常紧凑, 而且大都都用于编码蛋白质。人的基因组约为大肠杆菌基因组的 1000 倍那么大, 但基因的数目非常可能是大 50 倍而不是 1000 倍。今天对分子生物学的一个最大的挑战就是揭示绝大部分 DNA 的功能, 人基因组中 30 亿

以上个碱基对的功能, 它们并不编码蛋白质和 RNA 产物。

## 染色体中转录上活跃的区域是甲基化不足的和对 DNA 酶 I 超敏感的

真核生物中的基因表达, 也像原核生物中的一样, 是在很大程度上由转录的式样控制的。最早的一些证据来自于对发育中的昆虫的染色体的研究。果蝇唾液腺的巨大的多线染色体含有 1000 个以上排成一行的重复的 DNA 分子, 这些分子彼此没有分开。每一条多线染色体都有特征系列的带 (染色粒), 可在光学显微镜下看到。果蝇的染色体组含有约 5000 条带, 每条平均含有 10 个以下基因。当幼虫发育为蛹时, 某些带暂时膨大 (疏松), 因为该区域中的 DNA 由凝聚状态转变为分散状态 (前图 29-29)。

**疏松区 (puffs)** 相当于转录上活跃的区域。一项引人注目的发现是, 在分离的唾液腺中可由蜕皮激素 (一种昆虫的固醇激素) 诱导出疏松区来。特殊的条带膨大, 然后又以准确的时间顺序而收缩, 同时被合成的各种 mRNA 的数量发生变化。疏松是基因活化所必需的、但并非足够的条件。有些条带可因发育信号或因热休克而变得疏松, 但这些刺激所活化的一连串的基因是不同的。

基因活化以后的分子事件正在被阐明。DNA 对 DNA 酶 I 的敏感性是不同的。密装在核小体中的 DNA 可为低浓度的这种酶所消化, 形成的片段为 200 个碱基对的倍数, 就像用微球菌的核酸酶消化时所产生的一样。与此不同, DNA 酶 I 将 DNA 的转录上活跃的区域消化成小得多的和不规则的碎片。这些敏感的区域相当大。例如, 在珠蛋白基因中, 它们扩展到  $\alpha$  和  $\beta$  基因簇的 5' 和 3' 界限之外约 7kb 之多。对消化的敏感性增高意味着这些区域的核小体密度较低, 或者其核小体的结构有了变化。在这方面组蛋白的共价修饰, 例如磷酸化或泛素化 (ubiqui-

tionation)可能是重要的。其次,有些部位变得对DNA酶I的切割特别灵敏。大部分这些**过敏的部位**位于被转录基因的5'端。裸露的DNA对DNA酶I的消化并不过敏。过敏性大概是由于结合上了特殊的调节蛋白。珠蛋白基因和其他基因的过敏性是由于与两种非组蛋白HMG14和17相结合而造成的。HMG表示**高度活动的类群**(high mobility group),这些蛋白质小、而带有很多电荷。

**对消化的灵敏性的提高和超敏感性是具有组织专一性的和由发育调节的。**例如,在20小时龄的鸡胚中,红细胞样细胞(erythroid cell)的前体中的珠蛋白基因对DNA酶I不敏感。可是,在35小时后血红蛋白的合成开始时,这些基因就变得对消化敏感了。与此相反,脑中的珠蛋白基因在整个发育过程中和在成年期中,一直对DNA酶I有抗性。超过敏性也与基因簇中特殊基因的活跃表达相关。胎儿的红血球样细胞中的 $\gamma$ 、 $\delta$ 和 $\beta$ 基因的5'端对DNA酶I超敏感,而在成年人的骨髓细胞中只有 $\delta$ 和 $\beta$ 基因超敏感。

DNA中胞嘧啶的甲基化程度也与基因活性相关。胞嘧啶的C-5可由专一的转甲基酶所甲基化。哺乳类的DNA中约有70%的CG顺序是被甲基化的。比较用一对限制性核酸内切酶所切开的DNA的Southern印迹,可以估定甲基化的形式。Hpa II切开CCGG,但不能切开C<sup>m</sup>CGG顺序(C<sup>m</sup>表示甲基化的胞嘧啶);而Msp I则切开两者。**利用这些酶所作的研究证明,在非红细胞样细胞中,珠蛋白基因的甲基化程度很高,而在红细胞样细胞中则低得多。**例如, $\gamma$ 基因在-54这一位置上含有CCGG,即在TATA匣子和上游的启动子之间。这一顺序中一个胞嘧啶的甲基化就在DNA的主槽中放上了一个突出来的甲基,这就会干扰一种促进转录的因子的结合。甲基化也有利于B-DNA转变为Z-DNA。下列发现进一步强调了甲基化的重要性:含有珠蛋白基因的重组DNA的甲基化阻断它在转染细胞中的表达。尤其是,只有-760到+100这个区域内的甲基化,而不是基因的其他部分的甲基化,干扰转录。

甲基化作用在基因调节中的重要性的进一步证据来自于对5-氮胞苷(5-azaC)掺入DNA后的影响的研究。这一类似物中N-5代替了C-5,这就阻止了甲基化作用而引起了分化作用——也就是说,活化了那些本来不活动的基因。**一般来说,活化的哺乳类基因的甲基化程度要比不活化的小。**不过应当注意到,DNA的甲基化并不是高等真核生物中普遍的调节方法。果蝇的DNA就完全没有甲基化。

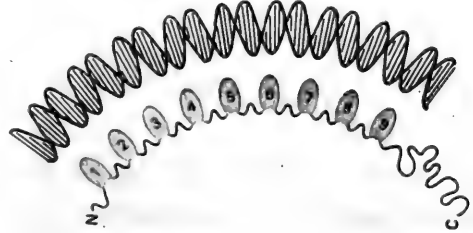
### 转录因子ⅢA含有与金属结合的指状物, 它活化5S核糖体RNA的基因

在前面一章(第29章)中已介绍了称为转录因子的专一的启动子,它控制真核生物的基因。例如,热休克基因就为一种专一的转录因子所活化,这种因子与TATA匣子上游的启动子部位结合。已发现爪蟾卵中为5S核糖体RNA编码的基因有另外一种控制转录的方式。5S核糖体RNA和转移RNA的基因均由RNA聚合酶Ⅲ转录,而为蛋白质编码的基因则由RNA聚合酶Ⅱ转录。去掉基因的一些部分,并确定其对转录速率的效应,于是鉴定出了一般为5S基因转录所必需的顺序。惊人的发现是,去掉起始部位上游的和终止部位下游的部分对所形成的转录本的数目没有什么影响。可是,基因中央的50个核苷酸的区域却被证明是有效的转录所必需的。这一调节部位被命名为**内部控制区**。

一种40kd的蛋白质,名为转录因子ⅢA(TFⅢA,transcription factor),识别内部控制区。

一分子 TFⅢA 结合一个 5S RNA 基因,形成一复合物,此复合物又依次结合 TFⅢC、TFⅢB 和 RNA 聚合酶Ⅲ。因子 B 和 C 也起着使 tRNA 基因开始转录的作用,而 TFⅢA 则对 5S RNA 的基因是专一的。在转录过程中,一个 TFⅢA 分子一直结合在基因上。TFⅢA 与 DNA 的编码链的相互作用比与其模板链的相互作用更为密切。

TFⅢA 有其特出的结构。它含有 9 个类似的结构域,每个结构域长约 30 个残基。这些重复段的每一个都在完全相同的位置上有 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸。其次,此蛋白质含有约 9 个锌离子。X 射线吸收实验已证明,每一锌原子以四面体的形式与 2 个半胱氨酸硫原子和 2 个组氨酸氮原子配位。30 个残基的重复单位大概是折叠成一个长的与金属结合的结构域,形如手指。每一个指状物约结合 DNA 中的 5 个碱基对,这相当于双螺旋的半转。9 个指状物应包括约 45 个碱基对,大体上就是内部控制区的长度(图Ⅲ-33-37)。指状物单位的尖端能放在 DNA 的或是主槽、或是次槽中。有许多指状物的蛋白质的优点是,在转录过程中它能够一直结合在内部控制区上。当 RNA 聚合酶横穿过基因时,TFⅢA 的几个指状物能够释放模板 DNA 链,而其它指状物仍连在双链或编码链上。



图Ⅲ-33-37 转录因子ⅢA (TFⅢA) 的结构域的构造。

结合金属的指状物与 5S rRNA 基因的内部控制区相互作用,以促进其转录。此 40kd 蛋白质的 10kd 的羧基末端参与形成一复合物,此复合物含有 RNA 聚合酶Ⅲ和其他转录因子。[据 J. Miller, A. D. Mclachlan, and A. Klug. *EMBO J.* 4 (1985): 1613.]

TFⅢA 基因的组织与它所编码的蛋白质的结构域的结构是一致的。基因中的前 6 个外显子相当于蛋白质的前 6 个指状物;最后一个外显子则编码 10kd 的羧基末端结构域,此结构域与其它转录因子和 RNA 聚合酶Ⅲ相互作用。基因的结构支持下列意见,即 TFⅢA 起源于一个为 30 个残基的结合金属的指状物编码的原始基因。最近已在各种各样与 RNA 和与 DNA 结合的蛋白质中找到了这种指状物结构域。例如,糖皮质激素受体就含有与金属结合的指状物结构域,这种受体是一种蛋白质,它与各种固醇类激素结合,并控制对它敏感的基因的转录。

### 同源转化因子是基因中重复出现的特点,它控制着昆虫和脊椎动物的发育

昆虫的躯体分成许多节,这是胚胎发生的早期形成的。果蝇有 3 个胸节和 8 个腹节(图Ⅲ-33-38)。不同节的细胞通常保留其同一性,而不互相混杂。然而,名为同源转化突变(homeotic mutation)的某些突变能将躯体的一种部分变为另一种部分。例如,触角-腿突变(Antennapedia mutation, Antp)把触角变成腿。能够推知,正常的 Antp<sup>+</sup> 基因决定腿长在正确的位置上。一般来说,同源转化基因控制着胚的基本结构方案。两个主要的同源转化基因簇是触角-腿复合物(Antennapedia complex, ANT-C)和双胸复合物(Bithorax complex, BX-C),ANT-C 调节头部和前面的胸节,BX-C 调节后面的胸节和腹节。

霍格纳斯(D. Hogness)和盖林(W. Gehring)利用染色体爬行技术阐明了这些大的同源

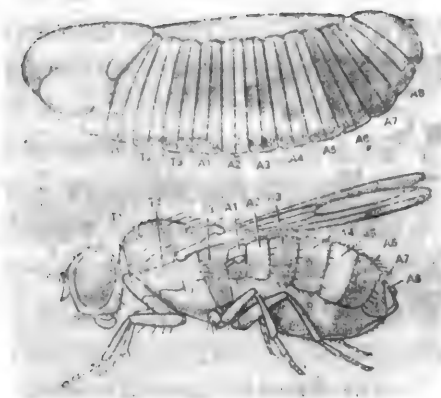


图 33-38 果蝇前和成虫分节的型式。  
分节是由同源转化基因控制的。

转化基因簇。ANT-C 比 100kb 还长, BX-C 则比 310kb 还长。杂交研究揭示出, 这些基因簇中有一共同的顺序。这种重复出现的特点已被证明是一个 180bp 的顺序, 称为同源转化匣子 (homeo box)。它编码一种 60 个残基的蛋白质同源转化结构域 (homeo domain) (图 33-39)。碱性残基的含量高说明同源转化结构域可能与 DNA 结合。确实如此, 含有同源结构域的蛋白质位于细胞核中并与特殊的 DNA 顺序结合。同源结构域可能含有螺旋-转角-螺旋的结构特点, 这种结构存在于原核生物中与 DNA 结合的蛋白质如 Cro 和  $\lambda$  阻遏蛋白中 (第 32 章)。

A SKRGRTAYTRPOLVELEKEFHFNRYLMRPRRVEMANLLCLT ERQIKIWFQNRRMKYKKN  
B RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHVLCLT ERQIKIWFQNRRMKWKKEN  
C RKRGRQTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLT ERQIKIWFQNRRMKWKKEN

图 33-39 在控制着发育的基因中同源转化结构域是一种重复出现的结构特点。哺乳类、两栖类和昆虫的这种顺序具有高度的同源性。此处所比较的顺序来自于: (A) 小鼠的 *MO-10* 基因, (B) 蛙的 *MM3* 基因, (C) 果蝇的 *Anlp* 基因。画有横线的 9 个残基的顺序在到目前为止已测序的 10 个以上的同源转化基因中毫无变化。

同源转化匣子不仅限于昆虫, 它也存在于两栖类和脊椎动物 (包括人) 的基因中。这一发现提出了这样一种引人注目的可能性, 即在昆虫和哺乳类发育中的基本过程要比以前设想的相似得多。发育的分子过程正在被描绘出来。我们正处在开始了解 DNA 中所含的一维信息如何转变为多细胞生物的精致而又美妙的三维形式。

## 第 34 章 病毒和致癌基因

TBSV 的外壳蛋白的易变性使得它能形成二十面体外壳

(上略) 另一方面, 落在里面的 RNA 链似乎并不采取一种十分固定的形状。它并不与外壳亚基的可变的氨基末端的臂和 R 结构域相互作用, 外壳亚基是深入到内部的。在 7.0 以上的 pH 下, 由于除去了与其结合的  $\text{Ca}^{2+}$  离子, TBSV 发生可逆的膨胀。由亚基界面上天冬氨酸侧链的静电斥力所引起的这种构象的转变, 在允许 RNA 进入和离开病毒颗粒方面可能重要。

南方豆花叶病毒 (southern bean mosaic virus, SBMV) 是球状的 RNA 病毒, 感染豆科植物的, 它也是由 180 个相同的亚基组建而成的。其多肽链的折叠确实与 TBSV 的相似。SBMV 含有由易变的关节连起来的 R 和 S, 但是没有 TBSV 的 P 结构域。这两种病毒的带正电荷的 R 结构域都是对位于病毒粒子内部的 RNA 的负电荷起中和作用。它们的 S 结构域的楔形十分适于形成二十面体的外壳。

类病毒是最简单的植物病原物，是类似内含子的小的环状 RNA

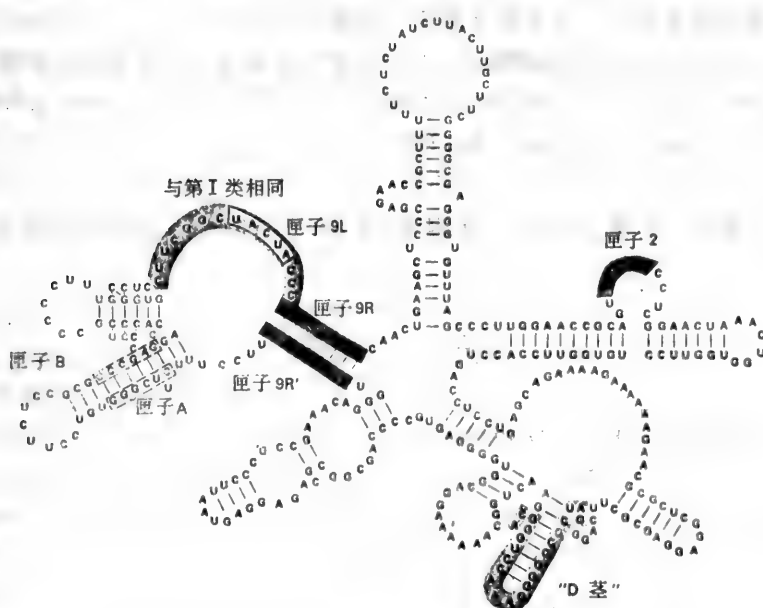


图 III-34-25 马铃薯纺锤状块茎类病毒, 一种 359 个核苷酸的环状 RNA 分子的可能折叠方式。这种传染性 RNA 中与第 1 类内含子同源的区域标有深浅不同的阴影。[据 G. Dinter-Gottlieb, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 (1986): 6251.]



类病毒是单链环状 RNA 分子, 长约 300 个核苷酸, 它们侵染植物 (图 III-34-25)。类病毒确实是最小的病原物, 它们没有外壳, 似乎也不编码任何蛋白质。1979 年第纳尔 (T. Diener) 提出, 类病毒可能是逃出来的内含子。顺序的比较表明类病毒与第 I 类内含子相似, 这是一类存在于核糖体 RNA、线粒体 mRNA 和 rRNA 和叶绿体的 tRNA 编码的基因中的内含子。这一发现支持上述假说。有纤毛的原生动物四膜虫的自我剪接的内含子即属于第 I 类内含子。类病毒含有一 16 碱基的顺序, 此顺序保留在这些内含子中。还有几种别的顺序也是类病毒和这类内含子所共有的, 说明它们具有共同的二级和三级结构。了解这种与内含子结构类似的类病毒是否能引起像卡丹-卡丹 (cadang-cadang) 这类植物病将是非常有趣的。在菲律宾这种病已杀死了 3000 万株以上的椰子树。

### 脊髓灰质炎病毒蛋白由巨大前体的多次切割形成

(上略) 最近以高分辨率阐明了脊髓灰质炎病毒的三维结构。二十面体的外壳由 60 个拷贝组成, 每个拷贝又有 4 种蛋白质, 称为 VP1、VP2、VP3 和 VP4 (VP 表示病毒粒子蛋白, virion protein)。P1 的切割 (由多蛋白质——poly protein——切割所最初形成的三种多肽之一) 产生 VP0、VP3 和 VP1, 它们组装成五聚体。许多五聚体又聚到一起, 形成病毒外壳; VP0 又同时被切割成 VP2 和 VP4, 它们使得组装过程成为不可逆的。这种切割是 VP0 本身催化的, 可能得到 RNA 的协助, RNA 位于正在组装起来的颗粒里面。

一般的伤风感冒是由人的鼻病毒 14 引起的, 这是一种微 RNA 病毒 (picorna virus)\*, 结构上与脊髓灰质炎病毒相似。它也有一衣壳, 由 60 个拷贝组成, 每一拷贝也有 4 种蛋白质, 它们来自于一种多蛋白质的顺次切割。其次, 脊髓灰质炎病毒和鼻病毒外壳蛋白的密装排列也与蕃茄丛矮病毒和其它二十面体的植物病毒的相像。在这些小的球状病毒中重复出现的结构特点可能反映它们来自于共同的进化起源。

### 流感病毒膜中的血球凝集素使得它进入敏感细胞

流感病毒和 VSV 一样, 也是膜包被的病毒, 带有 (一) RNA 基因组。它的 10 个基因位于单链 RNA 的 8 个隔开的片段上, 其大小从 890 至 2341 个核苷酸。这一直径为 1000 Å 的病毒颗粒 (参见图 III-34-31), 其被膜含有许多拷贝的 3 种蛋白质: HA (血球凝集素, hemagglutinin), NA (神经氨酸苷酶, neuraminidase) 和 M (膜蛋白, membrane protein)。HA 和 NA 是跨膜的糖蛋白, M 则在被膜的内表面上。在电镜照片上所看到的穗状物是 HA 的三聚体和 NA 的四聚体。血球凝集素分子使得病毒能够进入敏感细胞, 例如呼吸道内面的细胞。HA 对于这些细胞表面上的唾液酸有亲和力, 这使得病毒与细胞结合, 并通过以受体为媒介的胞吞作用而进入细胞 (第 31 章)。HA 也使病毒的膜与内小体的膜融合而将病毒 RNA 释放到细胞液

\* picorna viruses 表示小 (pico) 的 RNA (rna) 病毒 (virns)。这类病毒是被二十面体的蛋白质外壳 (直径 270 Å) 包围起来的单链 (+) RNA 分子。脊髓灰质炎病毒 (poliovirus)、鼻病毒 (rhinovirus) 和小牛的口蹄疫病毒都是微 RNA 病毒。Rhabdovirus 来自希腊文 rhabdo 杆, 是子弹形的病毒, 如水疱性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis virus) 和狂犬病病毒 (rabies virus)。



中。神经氨酸苷酶则切下末端的唾液酸残基，这可能有助于防止病毒被卷入粘膜的分泌物，这些分泌物中唾液酸很多。

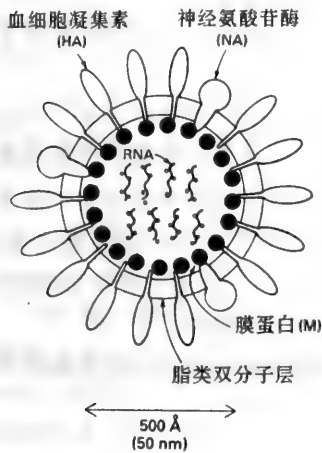


图 III-34-31 流感病毒 A 示意图。

新组装的病毒离开寄主细胞之后，62kd 的血球凝集素才被切开成两条链，即  $HA_1$  和  $HA_2$ ，它们是由二硫键和许多非共价的相互作用连在一起的。维莱 (D. Wiley) 测定了含有整个  $HA_1$  的三聚体和大部分  $H_2$  的可溶性片段的三维结构。蛋白质非常之长，突出到病毒的膜之外约 135 Å。由  $HA_1$  形成的唾液酸的结合部位，在蛋白质的尖端附近，与病毒的脂类双分子层很远。 $HA_2$  的疏水性极强的氨基末端区负责病毒被膜与内小体膜的融合。内小体的低 pH 活化了这一段融合顺序。

血球凝集素的抗体有效地阻断这种病毒的侵袭。不过，这种保护作用并非永久的，因为给流感病毒的  $HA_1$  区编码的 RNA 迅速改变着。因为在被感染的细胞中，病毒 RNA 的片段会发生遗传重组，所以常出现新的病毒株。流感病毒除侵染人外，还侵染鸟、猪和马。将动物来源的 HA 基因掺入到最适于感染人的病毒基因组中，可导致毒性极高的病毒株的形成。病毒基因组被分成段的特性显著地扩大了病毒外表的多种多样性，因而使得免疫保护的效应减低了。1919 年的流感使二千万人死亡，这是流感病毒逃避免疫反应巨大能力的突出表现。

### 呼肠孤病毒的基因组由 10 种不同的双链 RNA 分子组成

呼肠孤病毒 (reovirus，其字头 reo 来源于 respiratory enteric orphan 三个词的第一个字母)，是一种双链 RNA 病毒，感染哺乳动物细胞，它代表第三种类型的病毒基因体系。病毒粒子的核心含有 10 种不同的双链 (±) RNA 分子，它们与蛋白质结合在一起。进入寄主后，病毒粒子即失去其二十面体的外壳，外壳是由 3 种蛋白质组成的。去掉外壳使一种 RNA 聚合酶活化，这种酶在病毒粒子的核心中。这种由 RNA 指导的聚合酶完完全全地转录 10 种 (±) RNA 分子，因此所形成的 (+) mRNA 的长度和基因组片段的一样。不过，(±) RNA 模板是以不对称的方式和保守的方式转录的——也就是说，只形成 (+) RNA 链，而原来的 (±) RNA 双链并不被破坏。这些 mRNA 的 5' 端以核心中的酶作为帽子，然后通过核心上的孔道伸出来。所以，核心是一种有高度组织的组装体，用于 mRNA 的合成。10 种 mRNA 中的每一种都被翻译成一种蛋白质。在组装新的病毒时，一整套 10 个 (+) mRNA 分子即与某些病毒蛋白连接，形成一核心前体，在其上合成 10 条 (-) 链。

### 反病毒中的致癌基因由细胞中正常基因衍生而来

关于鸟肉瘤病毒的对温度敏感的突变体的研究使我们深入认识了转化作用的机理。有些突变种在高温下正常增殖，但不转化其寄主；而在低温下则都能进行。而且，在低温下由这些突变体转化的成纤维细胞，当温度增高时又会转回为正常的；当温度降低时，它们又变成

转化的。分析这些突变体得知，只有一个病毒基因——*src* 基因——与转化有关。*src* 基因从它能指导产生肉瘤的蛋白的合成而得名（肉瘤——sarcoma，来源于希腊文 sarkos——肉——和 oma——瘤）。*src* 蛋白是一种 60 kd 的激酶，它使蛋白质上的酪氨酸被磷酸化。免疫细胞化学标记的研究证明，*src* 蛋白是结合在质膜的泡液侧表面上的。现在还不知道 *src* 蛋白对靶子蛋白的磷酸化如何引起肿瘤状态。

病毒的 *src* 基因有细胞中的伙伴吗？毕绍普 (M. Bishop) 和瓦末斯 (H. Varmus) 所进行的杂交研究探明，正常的鸡细胞中有一种 *src* 基因，它与病毒的 *src* 基因非常相似。此细胞的基因名为 *c-src*，以与病毒 *v-src* 基因相区别。怎样知道 *c-src* 真正是细胞的基因，而不是掺入细胞基因组中的病毒基因呢？*c-src* 基因因为几个内含子所打断，而 *v-src* 基因是连续的。其次，在一种有机体的所有细胞中，*c-src* 基因均占据染色体中的同一位置。看来可能的是，鸟肉瘤病毒的前体由于不均等的交换获得了 *c-src*，而且这一基因突变成了 *v-src*。

像 *v-src* 这样产生癌基因叫做**致癌基因**。20 种以上反病毒致癌基因的分析证明它们与细胞中正常的基因极为接近。可将它们分为 5 类（表 III-34-5）：

表 III-34-5 反病毒致癌基因

类	别	致 癌 基 因	(反 病 毒)
酪氨酸激酶类		<i>abl</i>	阿伯尔森 (Abelson) 鼠白血病病毒
		<i>erbB</i>	禽白血病病毒
		<i>src</i>	禽肉瘤病毒
生长因子类		<i>sis</i>	类人猿肉瘤病毒
生长因子受体类		<i>erbB</i>	禽白血病病毒
与鸟嘌呤核苷酸结合的蛋白质		<i>Ha-ras</i>	哈维 (Harvey) 鼠肉瘤病毒
		<i>Ki-ras</i>	基尔斯坦 (Kirsten) 鼠肉瘤病毒
细胞核中的蛋白质类		<i>fos</i>	FBJ 硬肉瘤病毒 (osteosarcoma virus)
		<i>myb</i>	禽成髓细胞瘤病毒
		<i>myc</i>	禽肌细胞瘤病毒

1. 其中的许多种，如 *src* 蛋白，是**酪氨酸激酶**。正如在后面一章中将要讨论到的（第 38 章），酪氨酸激酶参与生长控制信号的传递。

2. 有些致癌基因的产物起**生长因子**的作用。类人猿肉瘤病毒的 *v-sis* 致癌基因就类似于血小板衍生的生长因子，是成纤维细胞、平滑肌细胞和胶质细胞生长的强有力的促进剂。

3. 其它致癌基因编码**生长因子的受体**。例如 *erbA* 编码甲状腺激素的受体，*erbB* 专门编码上皮生长因子的受体的一种截去了头的形式。*erbB* 蛋白也有酪氨酸激酶的活性。

4. 病毒的 *ras* 基因编码 21kd 的**鸟嘌呤核苷酸结合蛋白**。*ras* 在有活性的 GTP 状态与无活性的 GDP 状态之间循环。由于一个氨基酸的突变；它们变成高度致癌的，这种突变抑制其 GTP 酶活性。呈 GTP 形式的突变蛋白质总是处于活化状态。

5. 有几种致癌基因的产物是**细胞核中的蛋白质**。例如，鸟类的成髓细胞瘤病毒是引起白血病的，它编码一种与细胞核的衬质结合的蛋白质。这些蛋白质大概是由于改变了转录而发

生其致癌作用。

反病毒似乎并非人类癌症的主要原因。不过，它们在动物方面的致癌作用却是研究癌症的分子基础的源泉。反病毒之所以能转化敏感的细胞，是由于产生了过量的某种控制生长的关键性蛋白质，或是形成了一种无法控制的改变了的蛋白质。致癌基因的分析已揭示出，它们中的大多数都编码一种蛋白质，在控制正常的生长和发育中这种蛋白质起着关键性作用。这种分析还证明，与生长控制有关的细胞中正常基因的突变、复制或移位都可能引起癌症。细胞中能变成产生癌基因叫做原致癌基因（proto-oncogene）。

获得性免疫缺乏综合症（艾滋病）是由反病毒引起的

1981 年，认识了一种称为获得性免疫缺乏综合症（acquired immune deficiency syndrome, AIDS, 艾滋病）的新疾病的第一个病例。患者死于少有的感染，因为他们的免疫系统完全不起作用了。两年以后蒙塔格尼尔（L. Montagnier）和盖洛（R. Gallo）鉴定出了其病因。艾滋病是由人的免疫缺乏病毒（human immunodeficiency virus, HIV）产生的。这种反病毒与人的 T 细胞促淋巴瘤病毒 I（human T-cell lymphotropic virus I, HTLV-I）有关，这种 HTLV-I 是一种稀少的白血病的病因。HIV 的寄主细胞是 T4 淋巴细胞，这种细胞是发生免疫反应的活跃部位；这种淋巴细胞的名字来源于其表面上的抗原。T4 淋巴细胞在 B 淋巴细胞和其他 T 淋巴细胞的作用中

起着辅助性和诱发性细胞的作用。HIV 的病毒粒子与禽的肉瘤病毒类似，直径约 1000 Å。它由一脂类双分子层的外膜包被着，膜中有两种糖蛋白：gp41 是跨膜的，并以二硫键与 gp120 相连；gp120 则在外表面上（图 III-34-44）。此病毒的核心含有 2 个拷贝的 RNA 基因组和相联的各种 tRNA，以及几个分子的反转录酶。这些又被称为 p18 和 p24 的 2 种蛋白质的许多个拷贝所包围。由于病毒被膜中的 gp120 与质膜中叫做 CD4 的受体相互作用，HIV 进入 T4 淋巴细胞。这两种膜融合在一起，病毒的核心则直接被释放到细胞液中。

HIV 的 9.7kb 的 RNA 基因组与鸟肉瘤病毒的基因组在整体组织上相似，但复杂得多。gag、pol 和 env 各基因均与 LTR 结合（图 III-34-46）。HIV 还含有 4 个不寻常的基因，名为 sor、trs、tat 和 3'orf。多聚蛋白质（polyprotein）的酶切和 mRNA 的不同的剪接导致这一小小的基因组产生许多种蛋白质。tat 蛋白质与启动子部位结合，促进病毒 mRNA 的形成，而且可能也增加其翻译。trs 蛋白质影响剪接，从而加强了 gag、pol、env 和 sor 这些基因的表达。这些蛋白质巧



图 III-34-44 人免疫缺乏病毒（HIV），  
艾滋病的病原示意图。

被膜中有糖蛋白 gp41（棒状）和 gp120（椭圆形）糖蛋白。病毒的核心由两种蛋白质亚基 p18（稍有阴影的小圆）和 p24（白的大圆），一种 RNA 基因组（两条蚯蚓状物）和几个分子的反转录酶（黑点）组成。  
[据 R. C. Gallo, The AIDS virus. ]

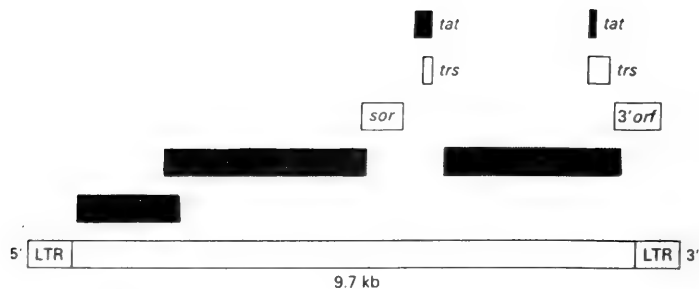


图 34-46 人免疫性缺乏病毒 DNA 形式的基因图。[据 R. Gallo. *The AIDS virus.* ]

妙地相互作用，使得 HIV 成为可怕的病原物。而且，*env* 以非常快的速率进行突变。由不同的病人，甚至同一病人在不同时刻所得到的病毒颗粒的 gp120 的氨基酸顺序表现极大的变异性。制备对 HIV 有效的疫苗也要比制备对遗传上稳定的病毒（如天花病毒和脊髓灰质炎病毒）的疫苗困难得多得多。

## 第35章 分子免疫学

其专一性已设计好的单克隆抗体是容易制备的

骨髓瘤免疫球蛋白的优点是均匀,但是通常不知道其相应的抗体是什么。1975年,密尔斯坦因(C. Milstein)和科勒尔(G. Köhler)发现,使产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合即可得到几乎任何一种所需专一性的大量的均匀抗体。用抗体免疫小鼠,数星期后取出其脾脏(图Ⅲ-35-10)。使这种脾脏中的淋巴细胞和血浆细胞的混合物在体外与骨髓瘤细胞融合,办法是把它们放在引起细胞融合的高分子聚乙二醇中。利用没有次黄嘌呤-鸟苷磷酸核糖基转移酶(HGPRT)的突变骨髓瘤细胞系,以便易于选择杂种。回想一下,在补救途径中,HGPRT催化次黄苷酸(IMP)的合成,IMP是AMP和GMP的前体。将细胞培养在含有次黄嘌呤、氨甲喋呤和胸腺嘧啶的培养基(HAT培养基, hypoxanthine-aminopterin-thymine)中,以杀死未融合的骨髓瘤细胞。此培养基中氨甲喋呤的作用是阻断核苷酸的新的合成。未融合的骨髓瘤细胞不能利用次黄嘌呤,因为它们没有HGPRT。脾细胞含有HGPRT,但它们在组织培养中死去了,因为它们不能在体外增殖。杂交的细胞则相反,能存活下来,因为它们有其骨髓瘤细胞的形成瘤的特性,又有来自其脾脏亲本细胞的HGPRT基因。这种细胞称为**杂交瘤细胞**。

**杂交瘤细胞**及其后代无限制地产生大量均匀的抗体,抗体的特性是由来自脾脏的亲本细胞所确定的。这些杂交瘤细胞培养在组织培养的平面培养基上的小杯中(图Ⅲ-35-10)。从这些小杯的上层清液中筛选对所研究的抗原专一的抗体分子。在阳性小杯中的细胞再被克隆,并再次进行筛选,以获得单一的一种杂交瘤细胞。这些细胞可以在盛有培养液的瓶中培养,也可注射到小鼠体内以诱导杂交瘤,杂交瘤会分泌所需要的抗体。另一种办法是,将细胞冷冻,并长期贮存。

产生**单克隆抗体**的杂交瘤法开辟了生物学和医学中新的前景。很容易制备大量均匀的抗体,其专一性是特制的。它们提供深入了解抗体结构与其专一性之间关系的途径。而且,单克隆抗体可以用作精确的用于分析和制备的试剂。例如,对于一种尚未分离出来的抗原,可以得到其纯的抗体。在研究细胞表面的蛋白质时,这一特点特别有用。利用单克隆抗体和荧光活化分拣细胞法,可以分离小群的淋巴细胞,这种抗体是对这些细胞上特定的蛋白质标志专一的。连在固体支持物上的单克隆抗体可用作亲和层析柱,以提纯稀少的蛋白质。这种方法曾用以从粗的混合物中纯化干扰素达5000倍。临床实验室正在将单克隆抗体用于许多种测定。例如,在血液中检测出正常情况下位于心脏中的同功酶就说明有心肌梗塞。现在也正在评估将单克隆抗体用于治疗的价值,例如治疗肿瘤。

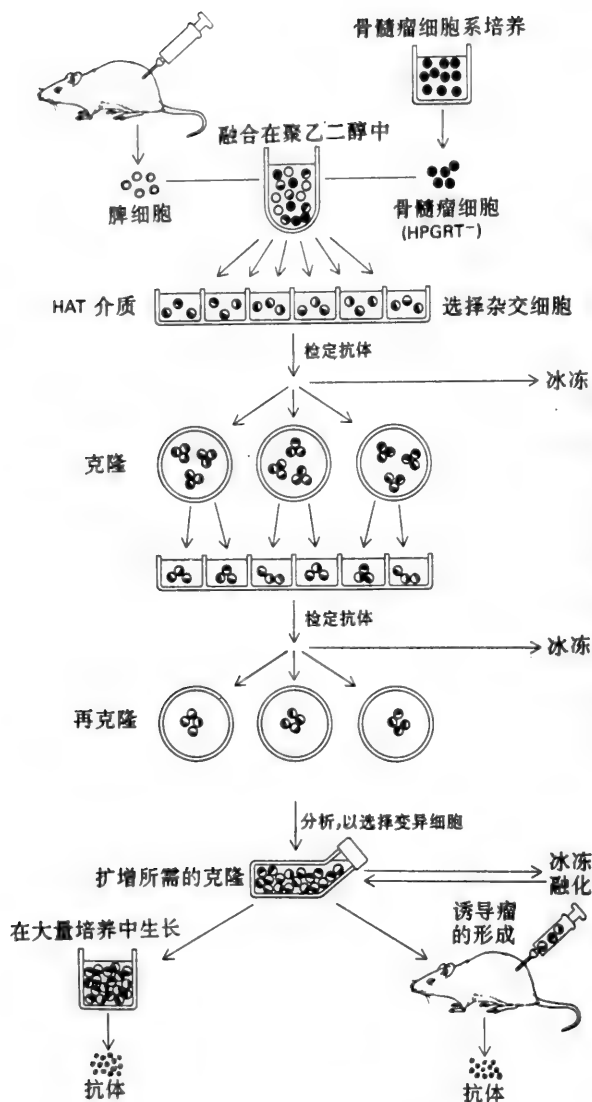


图 35-10 单克隆抗体的制备。

在 HAT 培养基中培养，以筛选杂交瘤细胞，此细胞是由产生抗体的细胞和骨髓瘤细胞融合而形成的。筛选这些杂种细胞是为了确定哪些是产生具有所需专一性的抗体的。

[据 C. Milstein. *Monoclonal antibodies*.]

恒定的区域传递效应剂的功能，如引发补体的级联反应

(上略) 补体系统在微生物和被感染细胞的质膜上形成洞，而产生溶菌和溶胞作用。质膜中有 15 种以上可溶性蛋白质参与这种精细调节的级联反应。抗体-抗原复合物引发溶胞作用是经由经典的途径进行的，从这一途径的第一个组分 C1 的活化开始。C1 由一个识别单位  $q$

和两个酶原  $r$  和  $s$  组成。C1q 是一六聚体，由三种链 (A、B 和 C) 组成，每条链约 23kd。C1q 的脯氨酸含量很高，这说明它的结构不寻常。真的，每一个 ABC 的三聚体形成一三条链的螺旋，像骨胶原中的那样。C1q 的整个结构很像一束共 6 朵的郁金香。每一个球状的头含有一结合部位，可与抗体分子的  $F_c$  部分结合。C1 不是由一个单独的抗体分子或是一单独的抗体分子与一个抗原所形成的复合物所活化，而是当一组几个  $F_c$  单位由于形成了多价的抗体-抗原复合物而集合到一起时，它们才起引发剂的作用。

C1r 和 C1s 位于 C1q 的头和茎所形成的空洞中。几个  $F_c$  单位同时结合到 C1q 的球形的头上时，就把 C1r 从酶原变成了蛋白酶。这一活化步骤中，C1r 发生了内部的酶切，它很像酸对胃蛋白酶原的活化。很可能的是， $F_c$  单位结合到 C1q 上就把一个起抑制作用的片段从 C1r 中拉出来了。活化的 C1r 又把 C1s 中的一个肽键打断了，使它成为有活性的蛋白酶。C4、C2、C3 和 C5 依次被酶切。然后 C5 的一个片段 C5b 与 C6、C7 和 C8 连在一起，透过带有抗原的膜。最后，大约有 16 个分子的 C9 结合在这个“桥头堡”上，使膜中产生了大的洞，从而导致靶子细胞的胞溶作用和破坏。

## X 射线分析阐明了抗体如何与半抗原和抗原结合

(上略) 大的抗原如何与抗体相互作用呢？两个最近解决了的抗原- $F_{ab}$  复合物提供了内容丰富的看法。一种对溶菌酶专一的单克隆抗体与两个多肽片段结合，在一级结构中这两个片段距离很远，一个是残基 18 到 27，一个是 116 到 129。L 和 H 链中每一个决定互补性的区域均与这一抗原决定部位相接触。12 个氢键和许多个范德华相互作用使这些接触面牢牢地贴在一起，这些面是相当平的。在形成这种复合物时，溶菌酶和  $F_{ab}$  片段在结构上变化很少，此复合物的离解常数为  $2 \times 10^{-8} M$ 。溶菌酶-抗体复合物可被看作是锁-钥的结合体，是两个几乎是刚体的东西的结合。与此相反，流感病毒外膜中的酶，神经氨酸苷酶的结构在它和  $F_{ab}$  结合时却有很大的变化。其次，抗体的  $V_L$  和  $V_H$  结构域在与此抗原结合时，相对错动 3 Å 而更加接近。这种结合的特点像是握手，而不是钥匙插在锁眼里。使人感兴趣的问题是，抗原所引起的构象变化是否在引发效应剂功能上有重要意义，例如在引发补体的级联反应上是否重要。

## J (连接) 基因和 D (多样化) 基因增加抗体的多样性

(上略) 重链的可变区域又是由另外一个基因片段编码的，此片段称为 D，D 代表多样性 (diversity)。大约有 15 个 D 片段在数百个  $V_H$  片段和 5 个  $J_H$  片段之间。一个 D 片段连结一个  $J_H$  片段；然后  $V_H$  片段就连在  $DJ_H$  上。重链的第三个决定互补性的区域 (CDR, complementarity-determining region) 主要由 D 片段编码。H 链而不是 L 链可以形成更多的与抗原结合的斑片 (patch) 和裂缝 (cleft)，因为 H 链是由 3 个基因片段而不是两个基因片段编码的。而且，重链的第三个 CDR 由于末端脱氧核苷酸基转移酶的作用而多样化了，这是一种特殊的聚合酶，它不用模板。这种酶把额外的核苷酸插入到  $V_H$  和 D 之间。

V、D 和 J 基因的这种部位专一的重组是由一些酶催化的，这些酶识别这些基因片段两侧的顺序。3' 侧的识别顺序包括一个保守的回文的七聚体，其后是一不保守的 12bp 的间隔区，再后又是一保守的、富于 AT 的九聚体 (图 III-35-31)。发生重组的片段的 5' 侧的识别顺序则包

括一保守的富含 AT 的九聚体,其后是一不保守的 23bp 的间隔区,再后是一保守的回文的七聚体。只有在 12bp 和 23bp 类型之间才能发生重组,在两个 12bp 或两个 23bp 之间都不能发生重组。例如,  $V_H$  片段和  $J_H$  片段在它们的 5' 侧和 3' 侧均有 23bp 类型的间隔区。因此,  $V_H$  和  $J_H$  不能彼此重组,它们本身也不能相互重组。但它们可与 D 片段重组,D 的 5' 和 3' 侧均为 12bp 类型的识别顺序。

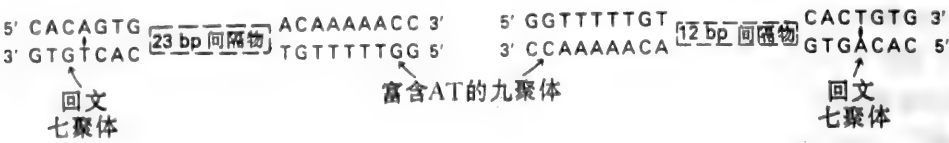


图 Ⅲ-35-31 V、D 和 J 基因片段重组的识别部位。

有两类部位,一类带有 12bp 间隔区,另一类带有 23bp 的间隔区。只有在不同类的部位之间才能发生重组。

淋巴细胞发生**等位基因的排阻**(allelic exclusion):一特定细胞只表达一对等位基因中的一个成员。限制酶切片段的分析证明,不完全的 V 基因只能在一对同源染色体中的一个之上与 J 基因正确地连结。只有正确地重组的免疫球蛋白的基因才能被表达。因此,由一单个细胞所产生的与抗体结合的部位是相同的。

### B 淋巴细胞由于把抗体结合在跨膜的免疫球蛋白上而被活化

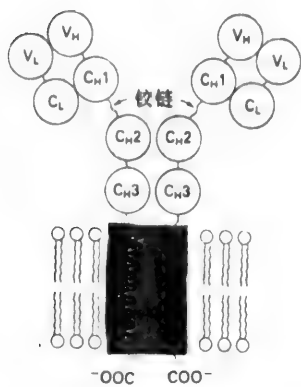


图 Ⅲ-35-40 与膜结合的 IgG 的结构域构造。

IgM 与膜结合的形式与 IgG 的类似,不过 IgG 的短的铰链为一较大的结构域所替代。

$\mu_m$  和  $\mu_s$  是怎样形成的呢?  $\mu$  链的基因和与膜结合的和可溶的两种形式的 mRNA 的分析表明,它们是由不同的剪接方式(图 Ⅲ-35-41)形成的。组装好的基因含有 8 个外显子和编码 2 个潜在的腺苷酰化部位(AAUAAA)。第一个多腺苷酰化部位就在最后两个外显子的 5' 侧,这

B 淋巴细胞是浆细胞的前体,抗原与其表面的受体结合就会引发其分裂和增殖。实际上,这些抗体的受体就是跨过质膜的免疫球蛋白分子。一特定细胞的与膜结合的抗体,其专一性与该细胞被活化后所分泌的可溶性抗体的专一性完全一样。这是怎样达到的呢?让我们来研究 IgM,这是出现在细胞表面上的和由细胞分泌的第一个抗体。IgM 的结合在膜上的形式( $\mu_m$ )与可溶的形式( $\mu_s$ )仅在其 H 链的羧基末端区有差别。 $\mu_m$  有一疏水顺序使它固定在质膜中(图 Ⅲ-35-40)。 $\mu_m$  的 H 链的羧基末端位于细胞液中,当抗原与此分子在膜外面一侧的那部分结合时即产生活化信号,这个羧基末端就传递这种信号。

反之,  $\mu_s$  溶于水相介质中,它没有疏水的尾,所以被分泌出去。 $\mu_m$  和  $\mu_s$  的 H 链的其余部分和整个 L 链都是相同的。因此,与膜结合的形式及其可溶性的伙伴具有同样的与抗原结合的专一性。

$\mu_m$  和  $\mu_s$  是怎样形成的呢?  $\mu$  链的基因和与膜结合的和可溶的两种形式的 mRNA 的分析表明,它们是由不同的剪接方式(图 Ⅲ-35-41)形成的。组装好的基因含有 8 个外显子和编码 2 个潜在的腺苷酰化部位(AAUAAA)。第一个多腺苷酰化部位就在最后两个外显子的 5' 侧,这



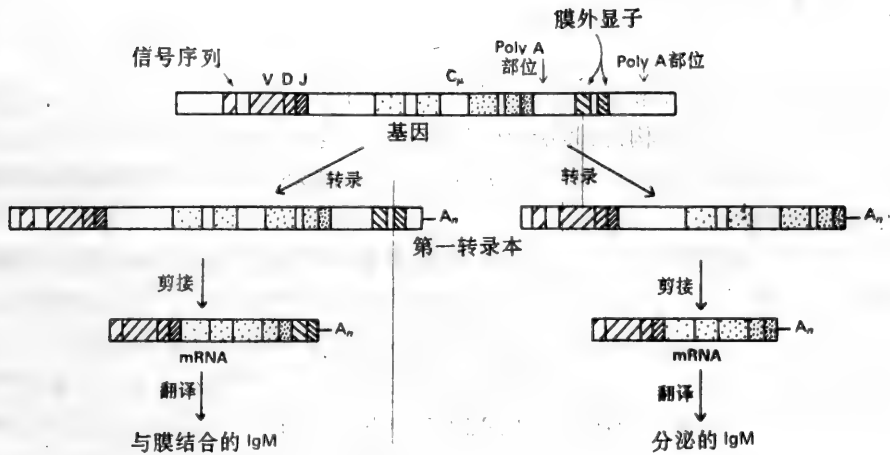


图 III-35-41 IgM 的与膜结合的和分泌的形式是因利用不同的多腺苷酰化部位和不同的剪接方式而形成的。

两个外显子是编码跨膜的锚区(anchor)的。这一部位的利用产生一初级转录本,它仅包括 6 个外显子;然后剪接就产生  $\mu_m$  的 mRNA。当较远的多腺苷酰化部位被利用时,则产生一较长的初级转录本,它含有全部 8 个外显子。这一转录本的剪接导致最后两个外显子被包括在内和第六个外显子的一小部分被切去。在抗原的刺激之前,第二个多腺苷酰化部位已被利用,于是形成  $\mu_s$ 。在这里我们看到一个清楚不过的例子,说明在细胞分化中是如何利用不同的剪接方式在一种蛋白质的两个密切相关的形式之间进行反复的选择。几种其他类别的免疫球蛋白(IgD、IgE 和 IgG)的与膜结合的形式和分泌的形式,也是利用不同的剪接方式形成的。

B 淋巴细胞是由多价的抗体结合在与膜结合的 IgM 上而被活化的。从抗体结合上去到 B 淋巴细胞发生分裂和分化之间,在分子水平上发生了一些什么变化,大都是未知的。磷脂酶 C 是与膜结合的酶,它水解磷脂酰肌醇三磷酸。此酶的活化可能是一关键步骤。在以后的一章(第 38 章)中将讨论这种酶在信号转换中的作用。有些被刺激的 B 淋巴细胞变成为浆细胞,这是专门合成并分泌可溶性抗体的细胞。其他的 B 淋巴细胞变成为记忆 B 细胞,以后这些细胞可被引发以进行分化而成为浆细胞。

## T 细胞杀死被侵染的细胞,并调谐 B 细胞的作用

我们现在来研究 T 细胞,它转达细胞的免疫反应。体液的免疫反应在与细胞外介质中的细菌和病毒作斗争方面最为有效。细胞的免疫反应则相反,它破坏被病毒侵染的细胞、寄生虫和癌细胞。T 细胞的表面含有跨膜的蛋白质,名为 T 细胞受体,它识别其它细胞表面上外源的分子。即将谈到,T 细胞受体是类似抗体的蛋白质。不过,它们与抗体又有几方面的区别:

1. T 细胞受体是不分泌出来的。T 细胞所表现的免疫反应是由位于其表面上的受体所引发的。反之,体液的免疫反应是由可溶性抗体分子转达的。

2. T 细胞受体并不能识别孤立的外源分子。外源单位必须位于细胞表面。明确地说,外源分子必须由一种特定的膜蛋白提供给 T 细胞,这种蛋白是由主要的组织亲和性复合物(MHC

major histocompatibility complex) 编码的。抗体识别溶液中的和膜上面的外源分子,而不管其环境如何。

3. 大多数 T 细胞受体识别相当短的肽,其长度小于 10 个残基左右。这些抗原决定部位一般在溶液中没有什么固定的结构。抗体所检测到的构象决定子则不同,它是由一条长的多肽链的折叠而聚到一起的残基组成的。实质上,抗体识别天然的大分子,而 T 细胞受体则识别由天然大分子衍生出来的片段。

有好几种 T 细胞。胞毒 T 细胞,亦称杀伤 T 细胞,破坏那些带着外源的抗原决定部位的细胞,这些部位是结合在 MHC 蛋白上的。这种外源物与 T 细胞受体的结合引起细胞分泌一种含有穿孔蛋白(perforin)的颗粒。这种 70kd 的蛋白质聚合而形成跨膜的小孔,宽约 100 Å,于是造成靶细胞的胞溶作用。穿孔蛋白与补体级联反应中的最后一个组分 C9 类似。其它类别的 T 细胞调谐 B 细胞的反应。辅助 T 细胞与 B 细胞结合,并通过分泌 B 细胞生长因子而刺激其增殖。为了发生刺激作用,T 细胞所识别的外源抗原决定部位必须在 B 细胞的表面上。

### 由两类主要的组织亲和性复合物(MHC)蛋白 把抗原提供给 T 细胞

把抗原提供给 T 细胞的蛋白质是因它们在移植排斥中的作用而被发现的。由一个人身上移植到另一人身上的组织,或一只野生小鼠身上移植到另一只身上的组织,通常都被免疫系统所排斥。反之,从单卵双生兄弟之一移植到另一人身上的,或在近亲交配系的小鼠之间移植的组织则能被接受。遗传学的分析表明,排斥发生于在具有不同基因的个体之间移植组织时,而且基因的不同又在于染色体中称为主要的组织亲和性复合物(MHC)这一区域中。这个大的区域(~3000kb)编码三类跨膜蛋白质。第 I 类蛋白质将外源的抗原决定部位提供给胞毒 T 细胞,第 II 类蛋白质将它们提供给辅助 T 细胞,第 III 类蛋白质则为补体级联反应的组分。第 I 类蛋白质存在于几乎所有的细胞中,而第 II 类蛋白质则仅限于免疫体系的细胞和吞噬细胞中。MHC 蛋白质变化极大。有多个基因位点编码第 I 类和第 II 类蛋白质,每一个又有许多等位基因存在于同一物种的个体中。因此,两个无关的个体而具有相同的第 I 和第 II 类蛋白质的可能性极小( $<10^{-4}$ ),这就是除非有配合密切的基因型,否则一定会发生移植排斥的原因。

第 I 类蛋白质包括一 44kd 的  $\alpha$  链,此链以非共价方式连结在一 12kd 的名为  $\beta_2$ -小球蛋白的多肽上。 $\alpha$  链有 3 个细胞外的结构域—— $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  和  $\alpha_3$ ,还有一个跨膜片段和一个细胞液中的尾(图 III-35-44)。各种第 I 类蛋白质之间的差别主要在  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  结构域中。 $\alpha_3$  结构域大部分是保守的,它与一恒定的  $\beta_2$ -小球蛋白相互作用。第 II 类蛋白质的总情况大体相似。它们由 35kd 的  $\alpha$  链和与之以非共价连接的 29kd 的  $\beta$  链组成。每条链都有两个细胞外的结构域,一个跨膜片段和一个短的在细胞液中的尾(图 III-35-45)。

第 I 和第 II 类蛋白质结合的是由外源蛋白所衍生的肽,而不是完整的蛋白质本身。外源蛋白质被纳入溶酶体内,并被消化。所形成的肽中有一些或是与第 I 类或是与第 II 类蛋白质一起被转运到质膜处。只有那些具有适当顺序的肽才能与特定的 MHC 蛋白质结合。此适当顺序称为聚集决定部位(aggretope)。例如,能与第 II 类蛋白质中的一种,即 E<sup>d</sup> 结合的肽,其共同顺序如下,×代表一可变的残基:

亮 精 精 丙  
谷 × × 赖 × × 赖  
缬 缬 缬

聚集决定部位的顺序

一项引人注目的发现是，在能够与这类肽结合的 MHC 蛋白质中的一个可变区域中，就存在这一共同顺序。换言之，MHC 蛋白质含有一内部的聚集决定部位。这样，能够被 MHC 蛋白质提供的肽与 MHC 蛋白质本身的一个部分是同源的。

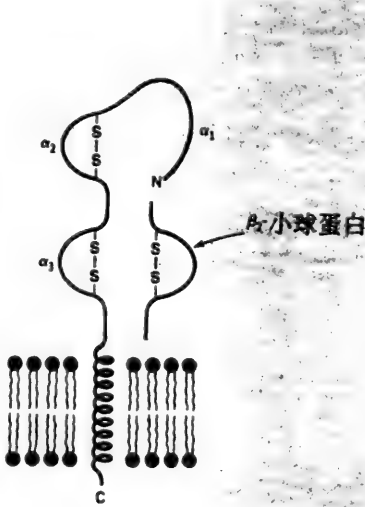


图 Ⅲ-35-41 第 I 类主要的组织亲和性复合物 (MHC) 蛋白质的结构域的构造示意图。

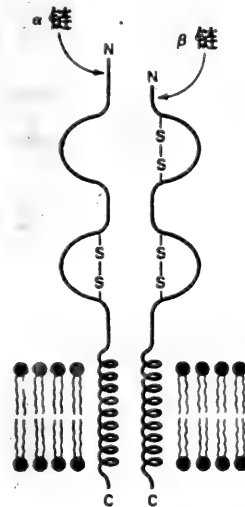


图 Ⅲ-35-45 第 II 类 MHC 蛋白质结构域的构造示意图。

威莱 (D. Wiley)、斯托尔明格尔 (J. Strominger) 及其同事最近解决了人的 MHC 第 I 类蛋白质的三维结构问题。 $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  结构域形成与抗原结合的部位，这两个结构域彼此非常相似，但与抗体的结构域不同。结合部位是一个深槽，长 25 Å、宽 10 Å，伸在  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  两个长的螺旋之间。 $\alpha_3$ -和  $\beta_2$ -球蛋白结构域与抗体的结构域类似，但以不同的方式成对。

为什么 MHC 蛋白质变异这么大？它们的多样性使得有可能向 T 细胞提供许许多多不同的肽。一种特定的第 I 类或第 II 类蛋白质恐怕不能结合来自于一种特定病毒的蛋白质水解而成的肽类，因为它们没有适当的聚集决定部位的共同顺序。多个位点和这些 MHC 蛋白质的等位基因的存在使得有这种可能，即至少其中有一个具有与其配合的内部的聚集决定部位的顺序。这样，有效的 T 细胞的反应就可能是针对被侵染细胞的。

T 细胞受体是类似抗体的蛋白质，含有可变的和不变的区域

在 1983 年以前，T 细胞的受体一直使研究者困惑不解。首次在杂交瘤细胞上鉴定出了这种受体，这是来自卵清蛋白和  $d$ -系的第 II 类 MHC 蛋白的肽的受体。筛选了对这些 T 细胞中大多数蛋白质专一的单克隆抗体，以寻找那些对 T 细胞受体的结合部位专一的抗体。测定的

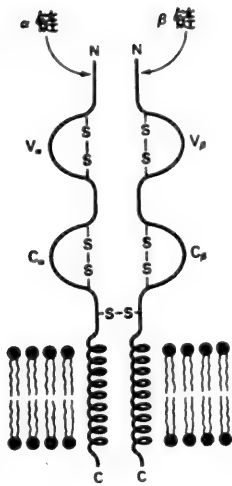


图 Ⅲ-35-47 T 细胞受体示意图。  
这种由二硫键连结起来的杂合二聚体由一个可变区域和一个不变区域组成。

根据是预期这些抗体中有一些将阻碍卵清蛋白的肽引发 T 细胞的活化的能力,因而导致所分泌的淋巴细胞活素减少。几种这样的抗体的制备导致 T 细胞受体的鉴定和分离。这种受体含有一 43kd 的  $\alpha$  链 ( $T_\alpha$ ), 此链通过二硫键联在 43kd 的  $\beta$  链 ( $T_\beta$ ) 上 (图 Ⅲ-35-47)。两条链均跨过质膜, 并有一短的羧基末端区在胞液侧。

几个月之后受体的基因就被克隆, 其顺序也被测定。所用的策略以三项假定为根据: (1) T 细胞基因应在 T 细胞中, 而不在 B 细胞中表达。(2) 受体的 mRNA 必定位于与膜结合的多聚核糖体上, 因为受体是一种膜蛋白。(3) 与免疫球蛋白相同, T 细胞受体的基因应在发育中重排, 以产生多样性。由膜结合的 mRNA 形成了 cDNA, 这类 mRNA 占总 mRNA 的 3% 左右。B 细胞所表达的顺序也由 cDNA 与 B 细胞 mRNA 的杂交而被除去。这种负杂交 (subtractive hybridization) 的技术可除去大部分 cDNA。筛选出了余下的 2%, 它相当于约 250 个核苷酸的顺序。筛选的目的是确定有无来自己发生重排的基因组 DNA 的顺序。果然发现一个具有这种特点的克

隆, 即含有 T 细胞受体  $\alpha$  链的基因的克隆。

许多 T 细胞受体基因的克隆和顺序分析揭示出,  $T_\alpha$  和  $T_\beta$ , 像免疫球蛋白的 L 和 H 链一样, 是由可变区和不变区组成的。T 细胞受体的这些结构域在顺序和三维结构方面确实是和免疫球蛋白的 V 和 C 结构域同源的。 $T_\alpha$  和  $T_\beta$  的 V 区域中存在变化特别大的顺序, 这说明外源的抗原决定部位的结合位点是由它们形成的。其次, 这些同源蛋白质的基因构造也与免疫球蛋白的类似。 $T_\alpha$  的可变区是由约 100 个 V 片段的基因和 50 个 J (联接) 片段基因编码的。 $T_\beta$  是由两个 D (多样性) 基因片段, 还有约 30 个 V 和 12 个 J 片段编码的。又是基因组分的多样性和不同的读码格局增多了所形成蛋白的种类。从这许许多多基因的结合可能产生至少  $10^7$  种不同的专一性。因此, T 细胞受体也像免疫球蛋白一样, 能识别许许多多不同的抗原决定部位。

T 细胞如何识别其靶子呢? 图 Ⅲ-35-49 所画为一工作假设。外源的肽结合在靶子细胞上的 MHC 第 I 或第 II 类蛋白质上。T 细胞受体的可变区识别这种结合在一起的抗原决定部位。T 细胞的表面还含有其它分子, 这些分子与靶子细胞上的 MHC 蛋白与其它标志物结合。目前的一项挑战, 就是了解结合在一起的抗原决定部位怎样使 T 细胞活化。迫切需要解决 T 细胞受体及其复合物的三维结构问题。

如前所述, T 细胞受体识别摆在细胞表面上的肽, 而抗体则识别溶液中的或细胞表面上的

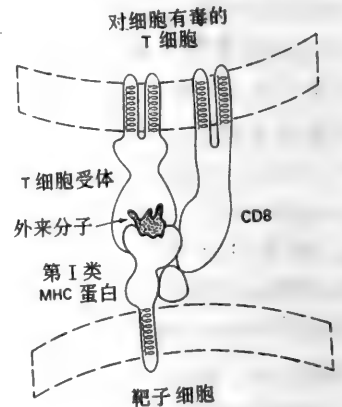


图 Ⅲ-35-49 T 细胞识别  
抗原的模型。

第 I 类 MHC 蛋白向 T 细胞受体提供一外源的分子。T 细胞还有别的细胞表面蛋白, 这些蛋白质与靶子细胞上的标志物结合。存在于靶毒 T 细胞上的 CD8 与第 I 类 MHC 蛋白结合。[据 J. Goverman, T. Hunkapiller, and L. Hood. *Cell* 45: 475-484.]

完整蛋白质。有两种识别办法的优点是什么？一种可能性是，从不同的地点来鉴别蛋白质可以提高专一性，以确定它们究竟是自身的还是外来的。病毒颗粒经常改变或掩饰其外壳，因而可以破坏抗体对它的鉴别。相反，不大可能的是，被侵染的细胞中由蛋白质的消化所产生的许多种肽能逃过 T 细胞系统的注意。多种 MHC 蛋白质以不同的方式提供外来的肽类，以保证它们被 T 细胞识别。免疫系统利用胞吞作用、溶酶体的降解作用和受体的再循环，以提供抗原的肽组分供 T 细胞仔细检查。

B 细胞和 T 细胞的相互作用也有助于防止向机体本身的蛋白质发生免疫反应。所有的识别过程发生错误的机会有限。不过，从不同的方面观察同一对象，可以把错误减至最少。一个 B 细胞由于与一种貌似外来的抗原结合而被引发，但完全的反应则要求辅助 T 细胞的确认。B 细胞上与膜结合的免疫球蛋白的判断必须得到 T 细胞受体的同意，才能引出对外来蛋白质的完全的抗体反应。

### 免疫球蛋白基因的超族编码多种蛋白质，它们是为细胞与细胞的相互作用搭桥的

免疫球蛋白的结构域之间在结构上的同源性有重要的进化上的意义。胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶在氨基酸顺序上的相似性指明它们起源于共同的祖先。同样，免疫球蛋白的不同结构域之间的同源性也说明抗体来自于基因复制和随后多样化的过程。祖先基因可能曾为一长约 108 个残基的原始抗体编码。这样一个祖先基因大概经过复制，所产生的拷贝发生多样化，于是形成不同种类的可变区域和不变区域。埃德蒙德森 (A. Edmundson) 曾提出：L 链的二聚体可能起过原始抗体的作用。

免疫球蛋白的折叠方式，即重复的特点，不仅存在于抗体分子中。在 MHC 第 I 类和第 II 类蛋白质中，T 细胞受体和参与细胞-细胞识别的许多其它蛋白质中，都找到了这种特点 (图 III-35-51)。例如，CD4 和 CD8 是辅助 T 细胞和胞毒 T 细胞表面的蛋白质，它们识别第 I

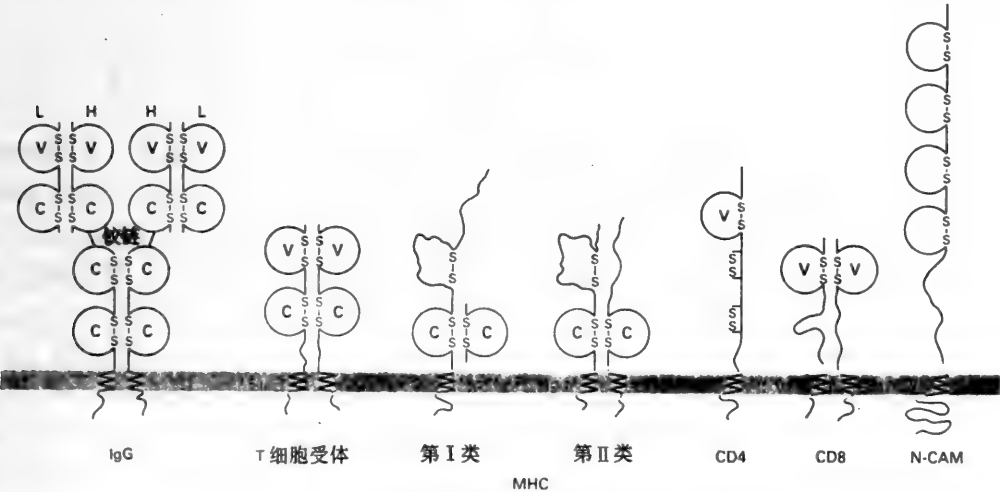


图 III-35-51 免疫球蛋白基因超族中几个成员的结构域的构造。  
可变结构域是有阴影的。[据 T. Hunkapiller and L. Hood. *Nature* 323 (1986): 15.]

类和第Ⅱ类 MHC 蛋白质中。免疫球蛋白的折叠方式也存在于一种由发育过程调节的神经元细胞粘着分子 N-CAM 中。在脊椎动物发育中重要的其他识别分子中, 这种特点可能起关键作用。

区别两类基因族 (gene family) 是有用的。**多基因族** (multigene family) 是指功能相似的一类同源的基因, 例如为不同类的免疫球蛋白或不同的丝氨酸蛋白酶编码的基因。**超族**是一组多基因族和单拷贝的基因, 它们在顺序上有关系, 有共同的祖先, 但功能是多种多样的。比如, 抗体和 MHC 分子是免疫球蛋白超族中的成员, 但在免疫反应中起着不同的作用。N-CAM 的功能更是不同, 但它的顺序、在细胞表面上的位置和在识别过程中起作用的能力均说明它是免疫球蛋白超族中的一员。

## 免疫反应揭示了选择机理的力量

如布尔奈特 (Burnet) 所表述的, 无性系选择理论 (clonal selection theory) 的实质是: “从任何一种进化的意义上说, 没有一种结合的部位是适应于一种特定的抗原决定因素的。结合部位的型式就在那里, 假若碰巧了, 它对一给定的抗原决定因素的吸附的亲和力超过了一定数值, 就会开始在免疫学上有意义的反应。”

在随机产生的、已经存在的型式中进行选择, 这并不是生物学中新的论题。它实在就是达尔文进化论的中心思想。注意到这一点是有趣的: 教育理论 (instructive theory) 总是先于选择理论, 拉马克的理论先于达尔文的理论, 抗原指导折叠的理论先于无性系选择理论。

吉尔尼 (Jerne) 曾提出, 我们应该考虑这样一种可能性, 即在神经系统的活动, 例如记忆中, 选择机理在起作用。事实上, 长期以来, 关于学习就有教育理论和选择理论两种说法。洛克 (Locke) 坚持认为, 大脑可能像一张白纸一样, 上面什么都没有, 经验可以在它上面画上差不多无穷尽的各种东西。反之, 苏格拉底 (Socrates) 则断言, “所有的学习都是唤起业已存在于大脑中的东西”。我希望你会觉得这一章是你所熟悉的东西!

## 概 要

(上略) 可变的和不变的区域是由分开的基因编码的, 在细胞分化过程中这些基因连接起来。L 和 H 链的 V 区有几百个基因。轻链的 V 区的完全基因是由不完全的 V 片段的基因和几个 J (连接) 片段的基因重新组合而形成的, J 片段的基因为最后的超级可变片段编码。J 基因的纵列簇位于 C 基因附近。重链的 V 区基因是由 V、D (歧化) 和 J 片段的基因重新组合而形成的。内含子则从初级转录本中被除去。所产生的 RNA 编码—氨基末端疏水信号顺序以及 V 和 C 区, 那个信号顺序则将从新生的链上被切去。将不同的 V、D 和 J 基因片段以及片段的体变异 (somatic mutation) 结合起来, 还有将不同的 L 和 H 链结合起来, 就能产生  $10^8$  个以上的不同的专一性。将  $V_H$  基因从一类的 C 基因上转移至另一类的 C 基因上, 就会形成不同类的抗体。利用不同的多腺苷酸部位和不同的剪接方式, 可形成与膜结合的和可溶性的免疫球蛋白。抗原与结合在膜上的免疫球蛋白的结合引发 B 细胞的增殖。

T 细胞所具有的细胞免疫反应是由靶细胞膜上的抗原片段与 T 细胞的受体相结合而引发的。外源分子必须由一种蛋白质提供给 T 细胞, 此种蛋白质是由主要的组织亲和性复合物

(MHC) 编码的。MHC 第 I 类蛋白质将抗原提供给对细胞有毒性的 (有杀伤作用的) T 细胞, 第 II 类蛋白质则将抗原提供给辅助性 T 细胞, 这种细胞刺激 B 细胞。T 细胞受体是跨膜的类似抗体的蛋白质, 含有可变的和不变的区域。它们通常识别外源蛋白的消化所产生的肽。T 细胞受体、免疫球蛋白和 MHC 蛋白都是免疫球蛋白超族的成员。这组基因编码的蛋白质含有免疫球蛋白折叠, 并负责细胞-细胞识别过程。



## 第 36 章 肌肉的收缩和细胞的运动

### 动蛋白沿着微管道单方向地推动囊泡和细胞器

微管也参与囊泡和细胞器的运动，几乎所有的真核细胞都有这种运动。调频增强对比度显微术 (video-enhanced microscopy) 的发展使得有可能看到  $300\text{ \AA}$  的囊泡在体内的运动。在神经元中囊泡的转运最为明显，可在长距离内迅速发生。囊泡从胞体向神经末梢运动的速率达  $5\text{ 微米/秒 } (\mu\text{m/s})$ ，这使它们在一天之内可走过约  $1\text{m}$  的距离。还发现，在神经轴突的细胞质中囊泡会迅速移动。这些运动的通道就是单个的微管。

在体外重组的能转移囊泡的系统的开发导致了一种新的、为 ATP 所推动的分子机器的发现。囊泡和细胞器是由动蛋白 (kinesin) 转运的，这是一种大的水溶性蛋白质，由两个  $110\text{kd}$  的亚基和一个  $65$  或  $70\text{kd}$  的亚基组成。动蛋白是非常长的分子，长约  $1000\text{ \AA}$ 。动蛋白的一端与囊泡的膜中的专一受体结合，另一端则与微管结合 (图 III-36-46)。对于不对称的细胞器，

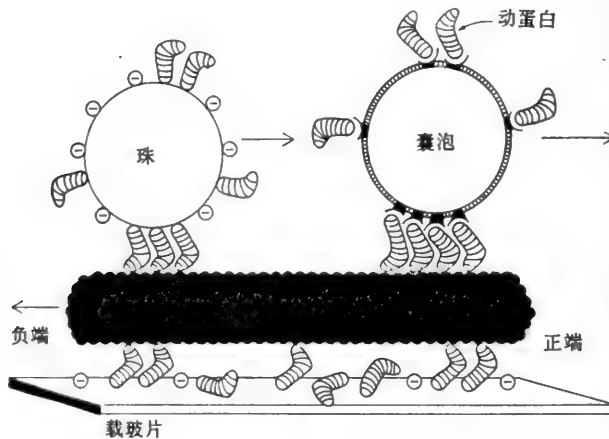


图 III-36-46 以动蛋白为媒介的沿着微管道的移动示意图。

动蛋白是由 ATP 推动的运动器。在微管表面上的含有动蛋白的囊泡或珠向微管的正端运动。动蛋白通过膜中的受体 (有阴影的小块) 而结合在囊泡上。相反，微管又能在带有结合的动蛋白的载玻片上移动。

如线粒体，进行观察，发现它们是沿着微管道爬行而不是滚动。每个细胞器有 5 个动蛋白分子就足以提供足够而有余的力量，产生  $2\text{ 微米/秒}$  的速度。含有动蛋白的细胞器或囊泡是从微管的负端 (即在中心体的一端，微管由此处伸长，见下节) 移向正端；这通常是产生由细胞中心向其外周的运动 (由前向后转运，anterograde, transport)。另一种机器 (由后向前的转运体，retrograde transporter) 尚有待分离，它应推动方向相反的运动。对于在细胞质中航行的颗



粒，微管的极性起着指南针的作用。

外面包了动蛋白的玻璃珠也像囊泡一样沿着同样的方向运动（图Ⅲ-36-46）。结合在载玻片上的动蛋白也推动微管丝的运动。动蛋白的这些作用和肌球蛋白 S1 头的作用类似。加入微管可促进动蛋白的 ATP 酶活性 50 倍，正如肌动蛋白和微丝促进肌球蛋白和动力蛋白的 ATP 酶活性一样。动蛋白所催化的 ATP 水解是与它在微管上的结合和与力的产生紧密偶联的。动蛋白与肌球蛋白和动蛋白的区别在于 ATP 促进它结合到其伙伴蛋白上，而不是从其伙伴蛋白上解除下来。当 ATP 连结在微管上时，动蛋白也使其水解；ATP 的水解使得动蛋白被释放，因而它就能进行沿着微管爬行的下一个步骤。在这方面，动蛋白像延长因子 Tu，Tu 在它所结合的核苷三磷酸被水解之前一直连接在氨酰基 tRNA 上。一种运动器（motor），当结合在其上的 ATP 已被水解时，它对于其伙伴蛋白质的亲和力可能变大，也可能变小。但无论是那种情况，能量转换的关键是在 ATP-ADP 循环中一对蛋白质的亲和力发生了很大的变化。

### 由 GTP 推动的微管的迅速的组装和拆卸是 形态发生中的核心问题

微管在决定细胞的形状和在有丝分裂中分开子染色体方面也是重要的。细胞中微管的形成是由  $\alpha$  和  $\beta$  微管分子加到已存在的丝上或形成细胞核的中心上而形成的。从头的（de novo）聚合很慢，因为许多个亚基必须同时聚集到一起以形成 13 个原丝（protofilament）的螺旋。细胞中的微管不是从头形成，而是从中心体和有丝分裂纺锤体的两极放射出来的，中心体在中心粒的外周。微管生长的起始部位称为微管组织中心（MTOC，microtubule-organizing center）。微管的负端就是结合在 MTOC 上的那一端，正端就是游离的那一端。秋水仙素是秋水仙中一种生物碱，它阻断微管的聚合，而抑制那些依赖于微管起作用的细胞过程。例如，秋水仙素的作用可以使正在分裂的细胞停留在中期，因为染色体的移动必需有微管。秋水仙素也抑制囊泡沿着微管道的移动，因此，这种化合物阻断许多分泌过程。好几个世纪以来，秋水仙素一直用于治疗痛风症的急性发作。

大多数微管都发生迅速的组装和拆卸。将有荧光的微管蛋白注入细胞，在大约 15 秒钟之内，它就掺入了有丝分裂的纺锤体，数分钟内则掺入其它微管中。结合在微管蛋白上的 GTP 的水解是微管迅速周转的核心问题。GTP-微管蛋白形成微管的临界浓度要比 GDP-微管蛋白的低得多。GTP-微管蛋白加在微管的正端上。几秒钟后结合态的 GTP 就被水解，微管蛋白是周转率低的 GTP 酶。位于微管之内的 GDP-微管蛋白单位停在那里无变化，但位于暴露端上的这种单位则与丝分离。因此，当 GTP-微管蛋白加到正端上的速率大于结合态 GTP 水解的速率时，微管就会变长。吉尔施奈尔（M. Kirschner）和密奇森（T. Michison）发现：在一群丝中，有些变长，而其它一些则同时变短。这种特性称为动态的不稳定性（dynamic instability），它来源于一种随机的变动，即取决于正端是带有 GTP-微管蛋白还是 GDP-微管蛋白（图Ⅲ-36-48）。

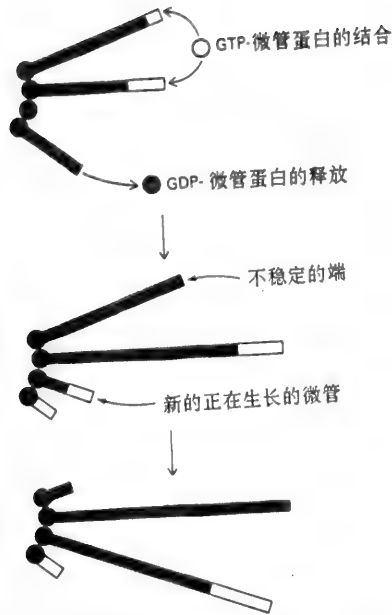


图 III-36-48 有些微管变长，有些变短，因为它们的末端不同。在末端上有 GDP-微管蛋白的微管（有阴影的）不稳定，其末端有 GTP-微管蛋白的（白的）则相反。微管蛋白本身带有 GTP 酶活性，此活性将结合的 GTP 变为 GDP。黑点为形成细胞核的部位，它与微管的负端结合。

微管的动态的不稳定性被用于细胞的发育。有丝分裂纺锤体的形成是富有启发的例子。微管把有丝分裂纺锤体的每一个极都连在着丝点上，着丝点位于子染色体的着丝粒上（图 III-36-49）。在两个极上形成核的部位并不把微管准确地对准着丝点的靶子而送出去，而是以千百条方向随机的微管从极上放射出去。到达着丝点的微管就稳定了，而其它微管则变成碎片，因为它们有暴露的正端。因此，动态的不稳定性产生许许多多结构；那些参与了结构性的相互作用的结构则变得稳定了。我们在这里，也像在免疫系统的作用中一样，看到了重要的是从随机变异中选择某些型式。

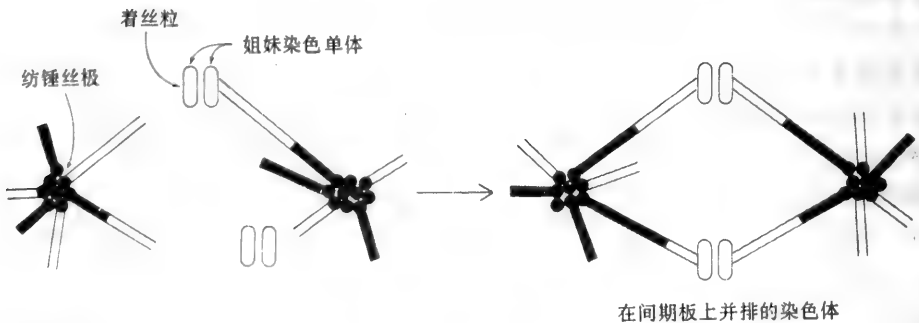


图 III-36-49 微管的动态不稳定性被利用于有丝分裂纺锤体的形成。

微管向许多方向的生长都从纺锤体的一极（黑点）出发。达到染色体的着丝粒的着丝点（空白）上的微管是稳定的。由于结合态 GTP（空白）水解而造成的自发的变动产生 GDP 末端（阴影）时，其它微管变短。[据 M. Kirschner and T. Mitchison, *Cell* 45 (1986): 339.]

## 概 要

(上略) 骨骼肌的收缩为  $\text{Ca}^{2+}$  所调节。当  $\text{Ca}^{2+}$  的水平低时, 肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用为肌宁蛋白复合物和原肌球蛋白所抑制。

神经的兴奋引发肌浆网释放  $\text{Ca}^{2+}$ 。肌宁蛋白 C 是一大类感钙蛋白中的一个成员,  $\text{Ca}^{2+}$  与肌宁蛋白 C 的结合改变了原肌红蛋白与肌动蛋白的相互作用, 于是肌红蛋白与肌动蛋白结合并产生收缩力。当脊椎动物的平滑肌的轻链被一种激酶磷酸化之后, 它就收缩, 这种激酶为  $\text{Ca}^{2+}$ -调钙素所活化。软体动物的平滑肌则由于  $\text{Ca}^{2+}$  结合在肌红蛋白的轻链上而直接被活化。

肌动蛋白和肌红蛋白是古老的蛋白质, 在几乎所有的真核细胞中它们都有收缩的特性。肌动蛋白形成直径为  $70\text{\AA}$  的微丝, 并参与范围广泛的细胞运动。细胞松弛素和鬼笔环肽抑制细胞运动是需要肌动蛋白微丝的周转。真核细胞的动态的细胞骨架还含有中等的微丝 (直径约  $100\text{\AA}$ ) 和微管 (直径约  $300\text{\AA}$ )。

微管在差不多所有的真核细胞中都有多种结构的和收缩的作用。这些直径为  $300\text{\AA}$  的中空的纤维是由球状的  $\alpha$  和  $\beta$  微管蛋白亚基组成的。秋水仙碱阻断微管的聚合, 从而抑制以微管为媒介的运动。真核的纤毛或鞭毛含有围绕着两个单个微管的 9 个双微管。外面的双微管是由动力蛋白 (一种 ATP 酶) 交联的。动力蛋白所诱导的相邻的双微管的滑动产生纤毛的局部弯曲并使之搏动。微管还是囊泡和细胞器运动的轨道。这些转运过程是由动蛋白 (kinesin, 另一种 ATP 推动的运动器) 进行的。由 GTP 推动的微管的迅速的组装和拆卸是它在细胞发育中的作用的核心, 有丝分裂纺锤丝的形成即其一例。假若微管未达到使其两端稳定的靶子, 它就会自动拆开。

## 第 37 章 膜 转 运

### 大多数真核细胞中有三类推动离子运动的 ATP 酶

向胃分泌酸是由  $H^+ - K^+$  ATP 酶进行的, 它能产生非常突出的上百万倍的质子梯度。这种 114kd 的蛋白质催化电中性的  $H^+$  对  $K^+$  的交换。它的顺序与  $Na^+ - K^+$  ATP 酶和  $Ca^{2+} - ATP$  酶的同源, 而且跨膜螺旋的情况也类似。 $H^+ - K^+$  ATP 酶, 像另外两种转运体一样, 在其催化循环中发生磷酸化作用, 并在两种主要的构象之间反复转变。这些哺乳动物的由 ATP 推动的离子泵所共有的结构上和机理上的特点是古老的。大肠杆菌的  $K^+ - ATP$  酶是把  $K^+$  泵入细菌细胞的, 它在其天冬氨酸残基附近的顺序与其它类似酶的顺序非常相像 (图 III-37-15), 天冬氨酸残基在转运循环中是暂时被磷酸化的。

A	A	K	R	M	A	R	K	N	C	L	V	K	N	L	E	A	V	E	T	L	G	S	T	S	T	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T
B	T	R	R	M	A	K	K	N	A	I	V	R	S	L	P	S	V	E	T	L	G	C	T	S	V	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T
C	A	K	R	L	A	S	K	N	C	V	V	K	N	L	E	A	V	E	T	L	G	S	T	S	V	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T
D	M	S	R	M	L	G	A	N	V	I	A	T	S	G	R	A	V	E	A	A	G	D	V	D	V	L	L	D	K	T	G	T	I	T	

↑  
磷酸化部位

图 III-37-15 P-类型 ATP 酶活性部位中天冬氨酸附近的氨基酸顺序非常保守。

(A) 羊肾的  $Na^+ - K^+$  ATP 酶, (B) 家兔心脏的  $Ca^{2+} - ATP$  酶, (C) 大鼠胃的  $H^+ - K^+$  ATP 酶, (D) 大肠杆菌的  $K^+ - ATP$  酶。比较 4 种顺序, 可看出它们之间相同之处。

这些酶是名为 **P-类型推动离子运动的 ATP 酶** 的一类转运体中的成员。这一类转运体的名字中的 P 表示它们的一个共同的关键特点, 即磷酸化的天冬氨酸中间产物。它们的质量约 100kd, 它们在  $E_1$  和  $E_2$  两种形式之间循环, 并且为钒酸盐所抑制。P-类型的 ATP 酶转运各种各样的阳离子。V-类型 ATP 酶类则相反, 它们仅转运  $H^+$ 。V 表示它们仅存在于围绕着真菌和酵母的液泡的膜中。相关的 ATP 酶也存在于与胞吞作用和胞泌作用有关的囊泡的膜中。这两种作用在溶酶体、内小体、笼形蛋白 (clathrin) 所包被的囊泡、分泌囊泡和高尔基体中都起着关键的作用。在高尔基体中, 酸化作用对于使蛋白质到位是重要的 (第 31 章)。V-类型的酶很大 ( $>400kd$ ), 由多个亚基组成; ATP 的水解和质子的转运是由不同的亚基进行的, 这些亚基在构象上是偶联的。我们已经讨论过 **F-类型的 ATP 酶**, 这是第三类。它们是由一个跨膜的单位  $F_0$  和一个与 ATP 结合的催化单位  $F_1$  组成的。尽管它们名为 ATP 酶, F-类型的这类酶的生理作用是利用质子梯度合成 ATP, 而不是进行相反的反应。大多数真核细胞含有所有这三种类型的 ATP 酶。原核生物含有 P-和 F-类型的 ATP 酶, 但没有 V-类型的。液泡的由 ATP 推动的质子泵是真核生物的发明, 这与它们进行胞泌作用和胞吞作用的明确的能力有关。

## 细菌视紫红质中视黄醛的光异构化作用在盐细菌中产生质子梯度

在光合作用中，光引起电荷分离；所产生的高电势电子向低势能流动，则产生质子梯度。在盐细菌（*Halobacterium halobium*）中发生的是简单得多和更直接的泵动质子的过程。这种古老细菌的生长需要高浓度的 NaCl，最适浓度为 4.3M NaCl（平常的海水含 0.6M NaCl）。盐细菌存在于天然的盐湖中和海水被蒸发而产生盐的区域中，如旧金山湾（San Francisco Bay）中封闭的浅滩中。斯托依肯尼鄂斯（W. Stoeckenius）把这种细菌的细胞膜分成黄、红和紫的部分。黄的部分是主要含有气囊（gas vacuole）的壁，气囊是使细菌能调节其在水中深度的器官。红的部分含有呼吸链和氧化磷酸化作用的其他酶系统，还有一种红的起屏蔽作用的色素，其作用是保护细菌使免受蓝光的致死效应。紫色的部分由一种 26kd 的蛋白质和 40 种共同存在的脂类组成。这种紫膜蛋白称为细菌视紫红质，因为它含有视黄醛作为其吸收光的基团。视黄醛是由  $\beta$ -胡萝卜素衍生出来的，已知它是动物眼睛中光受体蛋白视紫红质的发色团。视黄醛通过希夫碱连接与细菌视紫红质中专门的赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基相连。正如在前面一章（第 12 章）中所谈过的，细菌视紫红质的二维晶体的电镜分析表明，它含有 7 个排列紧凑的跨膜螺旋。

在  $O_2$  存在下，盐细菌进行氧化磷酸化以产生 ATP。当氧稀少时，它们转入光合作用的形式。1973 年，斯托依肯尼鄂斯和伊斯特海尔特（D. Oesterhelt）发现细菌视紫红质是光推动的质子泵。每吸收 1 个光子，就有 2 个质子从细胞液中跨过细胞膜而被运至外面。细菌视紫红质吸收一个光子即引起构象变化的循环（图 III-37-25），此色素用 BR<sub>570</sub> 代表，因为其吸收高峰为 570nm，这使它呈紫色。光使 BR<sub>570</sub> 的全反型视黄醛基团异构化为 K<sub>610</sub> 的 13-顺型，K<sub>610</sub> 是瞬时的吸收红光的中间产物。这种构象的过渡变化非常快，以皮秒计。然后在毫微秒和毫秒的时间范围内，出现一系列的中间产物，各有明确的吸收光谱（L<sub>550</sub>、M<sub>412</sub>、N<sub>520</sub> 和 O<sub>640</sub>）。在光循环中另一关键性的变化就是在导致 M<sub>412</sub> 的步骤中希夫碱的去质子化。在以后的步骤中，希夫碱再被质子化，视黄醛基团异构化为全反型，这使得细菌视紫红质变回 BR<sub>570</sub> 的形式。在强光下，每一个细菌视紫红质分子每秒钟泵出数百个  $H^+$ 。然后质子电力推动 ATP 的合成，并给其它离子泵提供动力。现在的问题是研究视黄醛中光推动的构象变化如何导致质子通过细菌视紫红质的定向的质子运动，这种色素是已知最简单的转换能量的蛋白质。

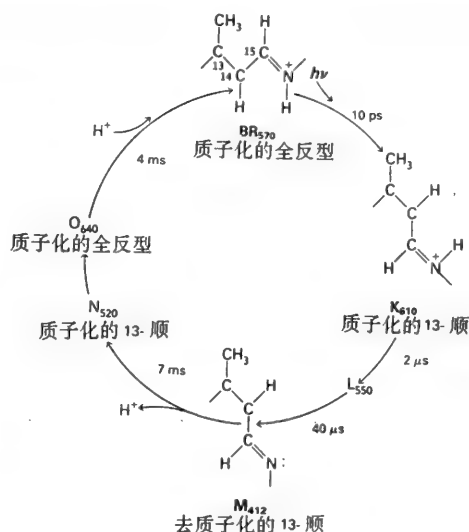


图 III-37-25 细菌视紫红质的光循环。原初的能量转换步骤是视黄醛的光异构化，由全反型变为 13-顺型。所吸收光子所含的 60 千卡/摩尔的能量中约有 30 千卡/摩尔保留在第一个光反应产物 K<sub>610</sub> 中。

盐细菌含有另一种离子转运体，那是由结合态视黄醛的光异构化推动的。**盐视紫红质** (halorhodopsin)，一种 27kd 的蛋白质，将氯离子从细胞外面泵至细胞里面。和细菌视紫红质一样，盐视紫红质也含有全反型视黄醛发色团，它通过质子化的希夫碱键与一专门的赖氨酸残基相连。这两种含有视黄醛的蛋白质，疏水情况非常相似，说明盐视紫红质也有 7 个跨膜的螺旋。而且，其氨基酸顺序也与细菌视紫红质的类似。**这些转运体不过是一种基本特点的变态，这种特点就是把视黄醛的顺-反异构化作用与离子的定向跨膜运动偶联起来。**它们具有不同的与离子结合的部位，但是把光变成离子的定向运动的格局则类似。这一大类视黄醛蛋白中的第三个成员是**感觉的视紫红质** (sensory rhodopsin)。这种光受体蛋白引发一种转换的级联反应，导致盐细菌朝向红光而离开蓝光进行运动。

表 Ⅲ-37-2 主动转运中自由能的来源

自由能的来源	转 运 系 统
ATP	<b>P-类型</b>
	动物细胞的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶
	动物细胞的 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶
	胃的 $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶
	大肠杆菌的 $\text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶
ATP	<b>V-类型</b>
	胞吞作用囊泡中的质子泵
ATP	<b>F-类型</b>
	线粒体的 $\text{F}_0 - \text{F}_1$ 、 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶
磷酸烯醇式丙酮酸	大肠杆菌的磷酸转移系统
质子电力	大肠杆菌的乳糖透过酶
钠电力	动物细胞的糖转运体
	动物细胞的 $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^+$ 反向转运体
电子电力	氧化磷酸化（如细胞色素氧化酶）和光合磷酸化
	（如光系统 Ⅱ）中的质子泵组装体
光	盐细菌（Halobacterium halobium）的细菌视紫红质和盐视紫红质

这就结束了我们关于主动的转运过程的讨论。我们看到这些过程可由各种各样能源推动——ATP、 $\text{H}^+$  梯度、 $\text{Na}^+$  梯度、光和高电势电子（表 Ⅲ-37-2）。在生物体系中所有已知的主动转运过程都是以取向不对称的跨膜蛋白质为媒介的。它们发生构象变化的循环，这种变化同时改变着结合转运对象的部位的方向和亲和力。在每一转运循环中，一小部分转运蛋白在瞬间被翻转。

## 红细胞的阴离子交换蛋白用氯离子交换重碳酸根

我们现在来讨论被动的转运过程,在这些过程中被转运的物质顺着其电化学势梯度而移动。红细胞含有一种 103kd 的膜本体蛋白,它是  $\text{HCO}_3^-$  与  $\text{Cl}^-$  交换的媒介。这种阴离子交换蛋白(或称阴离子通道或带 3 蛋白)是把二氧化碳从进行呼吸作用的组织中转运到肺中的关键。这种交换蛋白有两个结构域:亲水的氨基末端结构域起着固定在细胞骨架上的作用;疏水的羧基末端结构域跨过红细胞膜至少 12 次,它转运阴离子。这种转运体的关键性特点就是**交换过程不得不进行的特性**。一种阴离子(例如  $\text{HCO}_3^-$ )的流出与另一种阴离子(例如  $\text{Cl}^-$ )的进入紧密地偶联着。换言之,此蛋白质是一种**反向运输体**(antiporter)。这种一对一的交换意味着转运过程是电中性的,因而电荷上也没有变化。电中性的生物学意义就是重碳酸根-氯离子的交换不干扰膜电位。

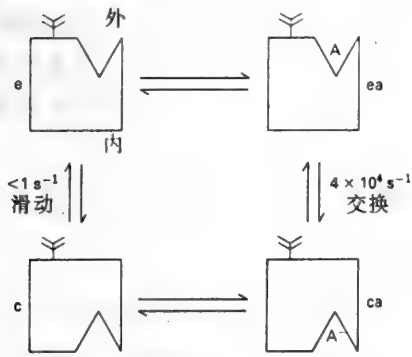


图 III-37-26 阴离子交换蛋白的最低限度的构象循环。

阴离子交换不能简单地由于离子通过一能选择阴离子的小孔进行扩散而发生,因而不能同时在两侧发生。一个最低限度的模型(图 III-37-26)必须有 4 种状态: $e$  为空的转运体,阴离子结合部位在细胞外面; $c$  为空的转运体,结合部位面对着细胞液; $ea$  为含有一结合阴离子的转运体,结合部位面对着胞外侧; $ca$  为含有结合阴离子的转运体,结合部位面对着胞液。这种转运体作用的关键性特点就是  $ea \rightleftharpoons ca$  的相互转变(交换)要比  $e \rightleftharpoons c$  的相互转变(滑动,slippage)快得多。交换转运的速率为  $4 \times 10^4 \text{ 秒}^{-1}$ ,而两个空状态之间的滑动为  $1 \text{ 秒}^{-1}$ 。**交换是不得不进行的,因为蛋白质的阴离子结合部位在没有**

**结合着的阴离子时不能以可觉察到的速率翻转。**事实上,阴离子催化着结合部位的内向形式与外向形式的相互转变。NMR 的研究证明,被转运的阴离子结合在一个精氨酸残基上,这个残基反复暴露在膜的相对的两侧上。精氨酸的必要性的进一步证据是,专门与这种残基起反应的 1,2-环己二酮阻断阴离子交换。

## 概要

(上略)盐细菌含有细菌视紫红,这是已知最简单的由光推动的质子泵。这种 26kd 的蛋白质含有一共价连接的视黄醛生色团,它在全-反型和 13-顺型之间循环。全反型视黄醛发生光异构化之后,西夫碱键就发生去质子化作用,两个  $\text{H}^+$  则由细胞里面被运到外面去。光也推动  $\text{Cl}^-$  的主动转运到细胞里面,这是由盐视紫红实现的过程,盐视红是一种类似的含有视黄醛的蛋白质。

起转运作用的抗生素由于起着载体的作用(例如缬氨霉素)或形成通道(例如短杆菌肽 A)而使得膜让某些离子透过。载体抗生素是形如面包圈的分子,它在中央空洞中结合一个金属离子。外周的碳氢链使得此复合物能够横穿过膜的碳氢化合物的内部。形成通道的分子则

产生一跨膜的水相的孔。

原核细胞和真核细胞还有水相的通道，允许离子和小的极性分子被动地经扩散作用而穿过膜。高等生物体内的许多相连的细胞是由缺口会合处（gap junction）连接起来的。这些 20 Å 的细胞到细胞的通道使得离子和大多数代谢物（例如，单糖、氨基酸和核苷酸）能够从一个细胞的内部流到相邻细胞的内部去。这些通道对于细胞间的通讯和代谢物的转移都是重要的。一个通道是由两个连接子（connexon）形成的，相邻细胞中每个细胞提供一个连接子。一个连接子则由 6 个相同的 32kd 的亚基组成。高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  之所以使缺口会合处关闭，是由于亚基的旋转和倾斜，它堵塞了水相的孔。



## 第 38 章 激素的作用

(上略) 最新发现的一类是花生酸类 (eicosanoids), 是由花生四烯酸形成的, 这是一种  $C_{20}$  的多烯脂肪酸。

近年来的研究揭示了激素作用中几个重复出现的特点。本章将集中讨论 4 种一般的机理。大多数激素结合在细胞表面的受体上, 并引发级联的酶促反应。腺苷酸环化酶级联反应导致环式 AMP 水平的提高和蛋白质激酶的活化, 这是主要的转换途径。磷酸肌醇级联反应是激素作用中另一种常用的途径: 一种膜磷脂的水解产生两种细胞内的信使——肌醇三磷酸打开钙通道, 二酰基甘油则活化一种蛋白质激酶。胰岛素和许多生长因子由于刺激其受体的酪氨酸激酶的活性而起作用。而且, 有几种致癌基因的产物也有酪氨酸激酶的活性或是引发这种级联反应。固醇激素和甲状腺激素以十分不同的方式起作用。它们进入细胞并与受体结合, 受体再被运入细胞核中, 并在其内与 DNA 上的专一部位结合。这些激素-受体复合物是转录的促进物 (transcriptional enhancers)。

### 与鸟嘌呤基核苷酸结合的蛋白质 (G 蛋白) 把激素受体与腺苷酸环化酶偶联起来

(上略) G 蛋白如何控制腺苷酸环化酶? GTP 在这一过程中的作用是什么? 吉尔曼 (A. Gilman) 曾证明, G 蛋白是膜的外围蛋白, 由  $\alpha$  (45kd)、 $\beta$  (35kd) 和  $\gamma$  (7kd) 亚基组成。它在 GDP 形式与 GTP 形式之间相互转变 (图 III-38-5)。GTP 形式活化腺苷酸环化酶, 而 GDP 形式则否。在没有激素时, 几乎所有的 G 蛋白均处于钝化状态。激素与受体的结合引发 GTP 与结合的 GDP 的交换: 激素受体复合物 (但不是未与激素结合的受体) 结合在 G 蛋白上, 于是引起已结合的 GDP 的释放, 并允许 GTP 结合上去。带有 GTP 的  $\alpha$  亚基 ( $G_{\alpha}$ -GTP) 从  $\beta\gamma$  亚基上解离下来。然后  $G_{\alpha}$ -GTP 活化腺苷酸环化酶。这样, 信息流是从激素-受体复合物到 G 蛋白, 然后再到腺苷酸环化酶 (图 III-38-6)。要点在于激素受体复合物催化 G 蛋白的活化。每有一个结合的激素, 就形成许多个  $G_{\alpha}$ -GTP, 于是所产生的反应就被放大了。(下略)。

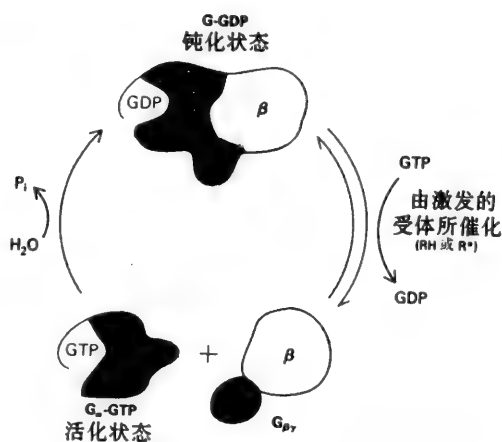
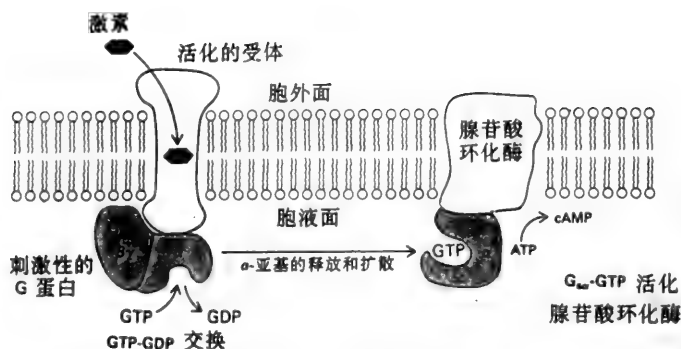


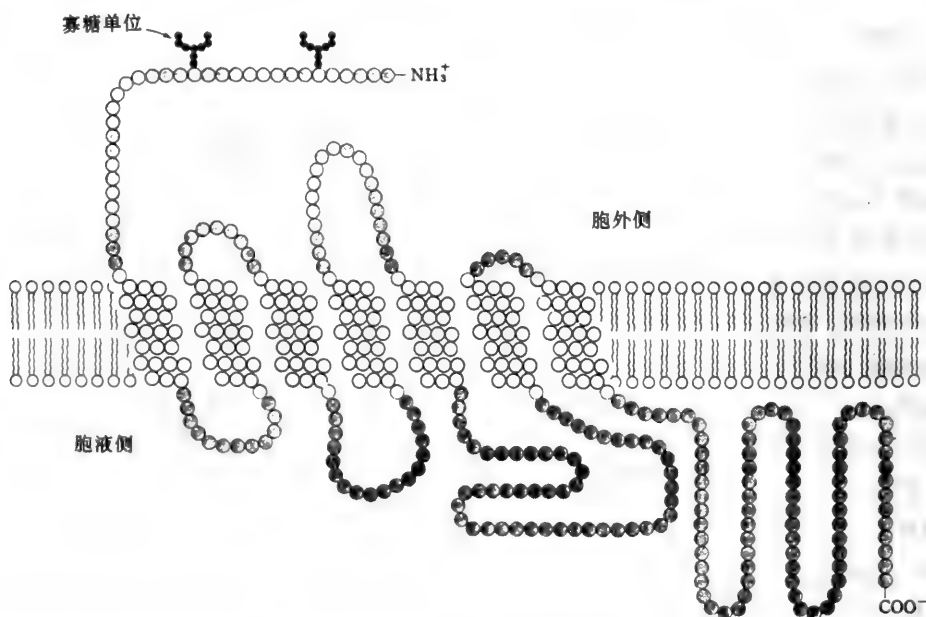
图 III-38-5 G 蛋白在钝化的 GDP 形式与活化的 GTP 形式之间转变。激素-受体复合物催化 GTP 与结合的 GDP 的交换。 $G_{\alpha}$ -GTP 活化效应剂蛋白。结合的 GTP 的水解使 G 蛋白回到无活性状态。此循环由 GTP 的磷酸基势推动。



图Ⅲ-38-6 由于激素与其专一受体的结合而使腺苷酸环化酶活化是以刺激性的 G 蛋白  $G_s$  为媒介的。一单个的激素-受体复合物催化许多个  $G_s$  分子的形成。结合在  $G_s$  的  $\alpha$  亚基上的 GTP 的水解终止腺苷酸环化酶的活化。

### $\beta$ -肾上腺素受体的七螺旋特点是 G 蛋白级联反应中重复出现的特点

肾上腺素通过与  $\beta$ -肾上腺素受体结合而引发腺苷酸环化酶级联反应，此受体为 64kd 的蛋白质，横跨靶子细胞的质膜。这种受体的提纯导致其基因的克隆和顺序测定。这种蛋白质的疏水性情况表明它有 7 个跨膜的螺旋(图Ⅲ-38-7)。例如，在视紫红质[视网膜杆细胞中



图Ⅲ-38-7  $\beta$ -肾上腺素受体折叠的假说。

这种七螺旋特点是活化 G 蛋白的跨膜受体的共同特点。跨膜螺旋为空白圆圈。两个 N-连接的寡糖单位在质膜的胞外侧上。胞液侧的一个环参与 G 蛋白的活化。羧基末端尾部许多个丝氨酸残基的磷酸化阻止受体与 G 蛋白相互作用。[据 H. G. Dohman, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz. *Biochemistry* 26(1987):2660.]

的光受体蛋白和蝇蕈碱的乙酰胆碱受体(它控制心细胞中的  $K^+$  通道)]中,就发现了这种**七螺旋的特点**。这些受体的氨基末端区含有 N-连接的寡糖,这些区域在膜的胞外侧,而羧基末端则在胞液侧。肾上腺素的结合部位在一个口袋中,这口袋是由跨膜螺旋形成的。

$\beta$ -肾上腺素受体对 G 蛋白的活化不仅仅决定于是否结合上了激素。长时间暴露在不变水平的肾上腺素下的受体分子就不再能有效地催化 GTP-GDP 的交换了。在刺激和反应之间的关系发生这种变化是感觉系统的普遍特点,称为**脱敏作用或适应作用**。信号转换系统是这样设计的,它们对刺激浓度的**变化**发生反应,而不是对其绝对浓度发生反应。适应作用是有利的,因为它使得受体能在刺激的本底浓度范围很大的情况下发生作用。 $\beta$ -肾上腺素受体的羧基末端区在适应中起着关键作用。这一区域的丝氨酸残基被一种专一的激酶所磷酸化,这种激酶作用于激素-受体复合物而不作用于单独的受体。在**多个部位的磷酸化使得激素-受体复合物不能催化 GTP-GDP 的交换因而阻断了信息转换**。磷酸酶除去连在上面的磷酸根就会恢复其敏感性。当我们讨论视觉激发的分子机理时,将再次遇到这种调节装置(图 III-38-8)。

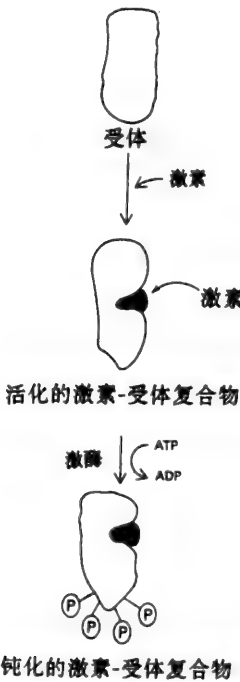


图 III-38-8  $\beta$ -肾上腺素受体被磷酸化作用所钝化。

激素受体复合物而不是单独的受体,被专一的激酶多次磷酸化。去磷酸化则恢复受体活化 G 蛋白的能力。

## 一大类 G 蛋白转换许多激素的和感觉的刺激

某些激素,例如鸦片样的和  $\alpha_2$ -肾上腺素样的胺类,会使靶子细胞中的环式 AMP 水平降低,并使得由这些细胞制备的膜制剂中腺苷酸环化酶的活性降低。这些药剂促进 GTP 的水解,因为它们抑制腺苷酸环化酶。作为它们的抑制效应的媒介的蛋白质,是由于目的不同的研究而发现的。这种研究是了解百日咳细菌(*Bordetella pertusis*)所产生毒素的作用方式。已证明百日咳毒素催化的是抑制性 G 蛋白( $G_i$ )的共价修饰,因而它阻断对腺苷酸环化酶的抑制。

和  $G_s$  一样, $G_i$  也由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基组成。事实上,这些蛋白质的  $\beta$  和  $\gamma$  亚基是完全相同的,它们的  $\alpha$  亚基也相似。这两类 G 蛋白的作用是由它们共同的  $\beta$  和  $\gamma$  亚基联系起来的。激素引发的未修饰的  $G_i$  中 GTP 与 GDP 的交换把  $G_i$  分裂成为  $\alpha$  和  $\beta\gamma$  亚基。然后释放出来的  $\beta\gamma$  亚基与  $G_s$  的  $\alpha$  亚基相结合,将对腺苷酸环化酶的活化作用逆转。这种抑制机理是有效的,因为含有的  $G_i$  比  $G_s$  多得多。百日咳毒素催化  $G_i$  中  $\alpha$  亚基上的一个专一的半胱氨酸侧链的 ADP-核糖基化反应。这种共价修饰使  $G_i$  固定为 GDP 形式。

表 III-38-2 以 G 蛋白类为媒介的生理过程

刺激	受体	G 蛋白	效应器	生理反应
肾上腺素	$\beta$ -肾上腺素受体	$G_s$	腺苷酸环化酶	糖元分解
羟色胺(Serotonin)	羟色胺受体	$G_s$	腺苷酸环化酶	海兔属行为的敏化和学习
光	视紫红质	转换蛋白	cGMP 磷酸二酯酶	视觉的激发
IgE-抗原复合物	肥大细胞的 IgE 受体	$G_{PLC}$	磷脂酶 C	分泌
f-Met 肽	向化性受体	$G_{PLC}$	磷脂酶 C	趋化性
乙酰胆碱	蝇草碱受体	$G_K$	钾通道	定向活动减慢

注: $G_{PLC}$  和  $G_K$  代表这些级联反应中尚未鉴定的 G 蛋白。

据 L. Stryer and H. R. Bourne. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2(1986):393.

$G_s$  和  $G_i$  都是一大类信号-偶联蛋白中的成员(表 III-38-2)。脑中 G<sub>o</sub> 很多, $G_o$  是一种功能尚不明的 G 蛋白( $G_o$  中的 o 表示“other”)。曾认为 G 蛋白与磷脂酶 C 的控制有关,此酶是磷脂酰肌醇级联反应(下节)中的效应器酶(effector enzyme)。它们与心细胞中  $K^+$  通道活性的调节有关。了解得最清楚的 G 蛋白是转换蛋白(transducin),它在视觉的激发中起着关键作用(第 39 章)。G 蛋白也参与白细胞的趋化性、嗅觉和无脊椎动物的简单形式的学习。这一大类有许多结构上和功能上的特点:

1. G 蛋白是活化的受体与效应器之间的中间体。它们是  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基的杂合三聚体。 $\alpha$  亚基含有鸟嘌呤基核苷酸的结合部位,并把激发信号带给效应器(酶或通道)。 $\beta$  和  $\gamma$  亚基是  $\alpha$  与活化的受体相互作用所必需的。

2. 它们在钝化的 GDP 形式与活化的 GTP 形式之间来回变动。活化的受体的作用是催化 GTP 与 GDP 的交换,导致 G 蛋白释放  $G_o$ -GTP。结合的 GTP 的水解使这一系统回到钝化的状态。

3. GTP 的抗水解的类似物,如 GppNHp 和 GTP  $\gamma$ S 持续地活化 G 蛋白。这些类似物一直

结合在  $\alpha$  亚基上,并使之保持在 GTP 状态。同样,  $\text{AlF}_4^-$  也会持续性地活化 G 蛋白类。 $\text{AlF}_4^-$  的形状和  $\text{PO}_4^{3-}$  的差不多相同;它结合在 GDP 旁边,仿佛是 GTP 的  $\gamma$ -磷酸基团,因而活化 G 蛋白。



4. 几乎所有已知的 G 蛋白都被霍乱毒素或百日咳毒素所 ADP-核糖基化。
5. 属于膜本体蛋白的受体活化 G 蛋白类。这些受体的共同特点是七螺旋特点。受体的羧基末端区的磷酸化阻断它们对 G 蛋白的活化。这些受体有同源性的进一步的证据是发现有些受体能活化几种 G 蛋白。

G 蛋白类在结构上和机理上的相似性意味着它们是由一共同的祖先基因复制和多样化而来的。原核的延长因子 Tu 与哺乳动物的 G 蛋白之间在顺序上的相似性说明与 GTP-GDP 的交换和水解相偶联的大分子的有控制的结合和释放是在进化的早期就已完善化了的,已经发展了好几十亿年。这种绝妙的分子设计现在已被用于范围广泛的细胞功能,包括蛋白质合成中大分子的转运、细胞增殖的控制和激素信号以及感觉刺激的转换。

### 受体引发的磷脂酰肌醇二磷酸的水解产生两种信使

我们现在转来讨论磷脂酰肌醇级联反应,它引起许多种细胞内的各式各样的反应(表 III-38-3)。磷脂酰肌醇级联反应也像腺苷酸环化酶级联反应一样,把细胞外的信号转变为细胞内的信号。由这一途径的活化所形成的细胞内的信使来自**磷脂酰肌醇4,5-二磷酸( $\text{PIP}_2$ )**,这是质膜中的一种磷脂。 $\text{PIP}_2$  是由磷脂酰肌醇( $\text{PI}$ )的磷酸化而形成的, $\text{PI}$  是膜的组分,由 CDP-二酰基甘油和肌醇形成的。例如羟色胺这样的激素与细胞表面受体的结合即导致**磷酸肌醇酶**(phosphoinositidase, 亦称**磷脂酶 C** 或多**磷酸肌醇磷酸二酯酶**)的活化。把磷酸化的肌醇单位与酰基化的甘油部分连结起来的磷酸二酯键为这种与膜结合的酶所水解。 $\text{PIP}_2$  的酶切形成两种信使——**肌醇1,4,5-三磷酸和二酰基甘油**。这一水解反应显著地受到 GTP 的抗水解类似物和  $\text{AlF}_4^-$  的促进,说明有一种 G 蛋白把激发信号从活化的受体带给了磷酸肌醇酶。百日咳毒素对这一级联反应的抑制也指明 G 蛋白的参与。

$\text{IP}_3$  是短命的信使,寿命仅数秒钟。它可因 3 种磷酸酶的依次作用而转变为肌醇。5-磷酸基团的除去即使其信使作用告终。肌醇1,4-二磷酸再被水解为肌醇-4-磷酸,随后再被水解为肌醇。另一方面,  $\text{IP}_3$  也可被磷酸化为肌醇-1,3,4,5-四磷酸,它再被水解为肌醇1,3,4-三磷酸,

表 III-38-3 以磷脂酰肌醇为媒介的效应

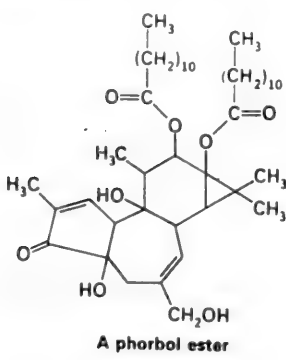
肝细胞中糖元的水解
肥大细胞分泌组织胺
血小板释放羟色胺
血小板的聚集作用
胰岛细胞分泌胰岛素
肾上腺嗜铬细胞分泌肾上腺素
平滑肌的收缩
无脊椎动物光感受器中视觉的转换

这是另一种异构体，与  $\text{PIP}_2$  裂解所形成的不同。这种1,3,4-异构体被相继的去磷酸化作用转变为肌醇。作用于肌醇1,3,4-三磷酸的磷酸酶为毫摩尔水平的  $\text{Li}^+$  所抑制。注意到锂离子广泛用于治疗躁郁病症是有趣的， $\text{Li}^+$  可能是由于抑制了1,3,4-三磷酸的再循环而发生治疗作用。在  $\text{IP}_3$  转变为肌醇的过程中所形成的某些化合物可能起信使作用。

二酰基甘油可被磷酸化而形成磷脂酸，它与 CTP 反应形成 CDP-二酰基磷酸。另一方面，二酰基甘油也可被水解为甘油及组成它的脂肪酸。花生四烯酸是  $\text{C}_{20}$  的多烯脂肪酸，它通常占据  $\text{PIP}_2$  的甘油部分的 2-位置，它是一系列花生酸激素（本章后面）的前体。所以，磷酸肌醇酸途径产生许多具有信号作用的分子。

IP<sub>3</sub> 将钙离子释放到细胞液中，二酰基甘油  
活化蛋白质激酶 C

$\text{IP}_3$  的作用是这样研究的：用显微注射法将其注入细胞中或加于质膜已变得通透的细胞中。贝利支 (M. Berridge) 发现  $\text{IP}_3$  引起  $\text{Ca}^{2+}$  从细胞内的贮藏所迅速释放出来，这种贮藏所是内质网或是平滑肌肉细胞的肌浆网 (sarcoplasmic reticulum)。细胞液中已增高的  $\text{Ca}^{2+}$  水平然引发诸如平滑肌肉的收缩、糖元的分解和胞泌作用等过程。事实上，将  $\text{IP}_3$  注入爪蟾的卵细胞中就足以活化受精作用中的许多早期现象，如颗粒 (granule) 的释放和质膜中离子通道的开放。低于微摩尔水平的  $\text{IP}_3$  就可从细胞内的贮藏所中动员  $\text{Ca}^{2+}$ ，这是由于直接打开了内质网和肌浆网的膜中的钙通道。



二酰基甘油是由受体引发的  $\text{PIP}_2$  的水解所形成的另一种信使，它活化蛋白质激酶 C。这种 77kd 的酶使许多靶子蛋白质中的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。例如，蛋白质激酶 C 使糖元合酶磷酸化，这就停止了糖元的合成。蛋白质激酶 C 的这种作用巧妙地补偿了  $\text{IP}_3$  所引起的糖元磷酸化酶活性的增高，这种变化是以细胞液中  $\text{Ca}^{2+}$  水平的提高为媒介的。实际上，二酰基甘油和  $\text{IP}_3$  的大多数效应都是相互增效的。西塚泰富 (Yasutomi Nishizuka) 发现，只有在  $\text{Ca}^{2+}$  和磷脂酰丝氨酸的存在下蛋白质激酶 C 才有酶促活性。二酰基甘油极大地增加蛋白质激酶 C 对  $\text{Ca}^{2+}$  的亲合性，因而使它在这种离子的生理浓度下就有活性。

无活性的酶主要位于细胞液中，而有活性的酶则与膜结合。蛋白质激酶 C 有一个催化的结构域和一个调节的结构域，二酰基甘油的结合使调节蛋白所施加于酶的抑制作用被逆转过来。一种多环醇双酯类 (phorbol esters) 的作用揭示了蛋白质激酶 C 在控制细胞分裂和增殖方面的重要性。这些来自巴豆油的多环醇的衍生物是致癌的；它们被称为肿瘤的启动者 (tumor promoter)。这种多环醇的双酯活化蛋白质激酶 C，因为它们与二酰基甘油相似。其活化作用是持续性的，因为这种多环醇双酯类与二酰基甘油不同，它们不易被降解。

## 调钙蛋白属于一大类感钙蛋白，它含有 螺旋-环-螺旋部位 (EF 手)

在许多信号转换途径中钙离子是细胞内的信使，磷酸肌醇酸级联反应和肌肉收缩的调节都是例子。为什么自然选择了这种离子作为如此众多信号传递过程的媒介呢？细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的水平必须保持在低的状态，因为磷酸酯极为丰富而钙的磷酸盐类是相当不溶的。所有的细胞都有把  $\text{Ca}^{2+}$  排出去的转运系统。在不兴奋的细胞中， $\text{Ca}^{2+}$  在细胞液中的浓度典型的是  $0.1\mu\text{M}$ ，比细胞外的环境中小好几个数量级。这么陡的梯度给细胞提供了一个机会：通过瞬时开放质膜中或胞内的膜中的钙通道，可以突然提高胞液中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度，以达到传递信号的目的。

$\text{Ca}^{2+}$  的第二个性质是它能与蛋白质紧密结合，这也使它非常适于作为细胞内的信使。带负电荷的氧（来自谷氨酸和天冬氨酸的侧链）和不带电荷的氧（主链中的羰基）与  $\text{Ca}^{2+}$  结合得很好。 $\text{Ca}^{2+}$  能与多个配体——6 至 8 个氧原子——配位的能力使得它能把一种蛋白质的不同片段交联起来，并引起大的构象变化。而且， $\text{Ca}^{2+}$  的结合可能有高度的选择性。 $\text{Mg}^{2+}$  是一个潜在的竞争者，但因为它对不带电荷的氧原子没有什么亲和力，所以不在话下。这两种离子之间的另一个重要区别是，镁易形成小的和对称的配位壳，而  $\text{Ca}^{2+}$  则能形成不对称的、半径较大的复合物。所以， $\text{Ca}^{2+}$  非常适于与蛋白质中形状不规则的裂缝结合，即使当镁的浓度超过钙上千倍时，仍是  $\text{Ca}^{2+}$  而不是  $\text{Mg}^{2+}$  中选。

钙结合蛋白的 X 射线结晶学的研究提供了这些感觉蛋白 (sensor) 如何起作用的内容丰富的看法。小清蛋白 (parvalbumin)，鲤鱼肌肉中的 12kd 的蛋白质，含有两个类似的钙结合部位，这两个部位是由一个螺旋、一个环和另一个螺旋形成的。8 个氧原子与每一个  $\text{Ca}^{2+}$  配位：6 个羧基的氧来自 3 个天冬氨酸和 1 个谷氨酸，1 个主链的羰基氧和 1 个来自结合态水分子的氧。一个部位是由这种蛋白的 E 和 F 螺旋形成的，它们的位置犹如右手的食指和拇指。 $\text{Ca}^{2+}$  结合部位就是由这两个螺旋之间的环形成的。克莱特辛格 (R. Kretsinger) 称这种结构特点为 EF 手，并提出小清蛋白的两个  $\text{Ca}^{2+}$ -结合部位来自于一原基因 (primordial gene) 的复制，此基因编码 Ca-结合环。他注意到小清蛋白和肌宁蛋白 (troponin) C 的氨基酸顺序相似，并认为肌宁蛋白 C 也含有 EF 手。以后的 X 射线研究证明，EF 手是肌宁蛋白 C 和其它钙-结合蛋白中重复出现的特点。

调钙蛋白 (calmodulin) 是这一大类蛋白质中一个 17kd 的成员，它在几乎所有的真核细胞中起着钙检测器的作用。它由两个类似的半球组成，其间由一长的  $\alpha$  螺旋连结起来。每一半球含有两个  $\text{Ca}^{2+}$ -结合部位，即 EF 手单位，它们相距  $11\text{\AA}$ 。因此，组成调钙蛋白的是以 EF 手为基础的重叠的单位。一个半球中的部位对  $\text{Ca}^{2+}$  的亲和力高，另一个半球中的则对此离子的亲和力低。 $\text{Ca}^{2+}$  结合在这两个部位上就活化了调钙蛋白，使得它能够刺激许多种酶。 $\text{Ca}^{2+}$  所引起的构象变化尚未被直接看到。光谱学的研究和模型的建立说明， $\text{Ca}^{2+}$  结合在 E 和 F 两个螺旋之间的环上，使每一个螺旋围绕着它的轴旋转并移动位置。这种变化能使调钙蛋白变成对靶子蛋白亲和力强的形式。

## 钙离子载体、缓冲剂和指示剂是有价值的实验工具

对钙专一的试剂的使用极大地促进了我们对钙在细胞过程中作用的了解。**离子载体**，

如 A23187，能横跨脂类的双分子层，因为其外围是亲水的（图 III-38-19）。可用它们将  $\text{Ca}^{2+}$  引入细胞或细胞器中。通常因激素与细胞表面的受体结合而引发的许多生理反应也能利用钙离子载体提高细胞液中钙的水平而引发。反之，引入对钙专一的螯合剂，如化合物 EGTA [乙二醇双（ $\beta$ -氨基乙醚）-四乙酸，ethylene glycol bis（ $\beta$ -aminoethyl ether）-(N,N',N'-tetraacetate)]，则能使细胞中不结合的钙浓度极低（纳摩尔或更低）。假定有以细胞液中  $\text{Ca}^{2+}$  水平的升高为媒介的过程，那么螯合剂存在下游离钙的极低水平就应阻断它。

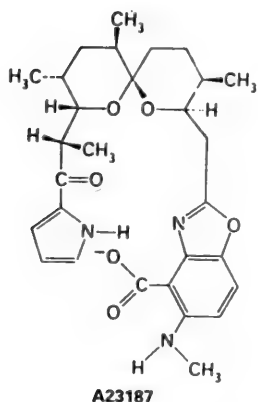


图 III-38-19 一种钙离子载体  
A23187 的结构式。

细胞中未结合的  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度可用荧光探针进行监测。Fura-2，一种多环的螯合剂，当它与钙络合时，荧光强度即改变。纳摩尔至微摩尔范围内的钙浓度也可以用水母蛋白(aequorin)进行测定，水母蛋白是发光水母(Aequorea forsklea)产生的蛋白质。这种生物发光的蛋白质含有一荧光的发色团，与  $\text{Ca}^{2+}$  结合时它就发光。注入细胞中的0.1皮摩尔（约2纳克）的水母蛋白能发射出  $10^{10}$  个光子，发射光子的速率依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度。

## 类花生酸激素由多烯脂肪酸衍生而来

我们现在来讨论前列腺素类，这是一类脂肪酸，它们影响许许多多生理过程。这些化合物发现于20世纪30年代，但只是到了60年代才为人们所注意，这主要是由于伯尔格斯特罗姆(S. Bergstrom)的开拓性工作。前列腺素是含有一个五碳环的二十碳脂肪酸。它们首先是在前列腺的分泌物中被发现的。前列腺素类是由花生四烯酸( $\text{C}_{20:4}$  脂肪酸)和其他多烯脂肪酸衍生而来的。还原酶类和异构化酶类的加工形成一系列的前列腺素。主要的类别由PGA到PGI表示，右下角的数字表示环外碳-碳双键的数目。有两个双键的前列腺素，如  $\text{PGE}_2$ ，是由花生四烯酸衍生而来的；这一前体的另外两个双键在形成五员环时丢失了。凝血噁烷是含有六员醚环的相关化合物。另一方面，在脂氧合酶的作用下，花生四烯酸可转变为白血三烯(leukotriene)。这些化合物首次发现于白血球中，含有3个共轭双键，因而得名。前列腺素类、凝血噁烷类和白血三烯类统称为类花生酸类(eicosanoids)，因为它们都含有20个碳原子(eikosi是希腊文的二十)。

前列腺素类和其他类花生酸类是局部激素，因为它们寿命短。它们改变合成它们的那些细胞以及相邻细胞的活动。这些效应的特性因细胞类型而异，这与全身的激素如胰岛素和胰高血糖素的比较一致的作用不同。前列腺素  $\text{PGE}_1$  在脂肪组织中的作用机理曾得到详细的研究。像肾上腺素、胰高血糖素、促肾上腺皮质激素和刺激甲状腺的激素均刺激脂肪的水解。浓度为  $10^{-8}\text{M}$  的  $\text{PGE}_1$  却强烈地抑制这些脂肪水解的效应。另一项有关的发现是  $\text{PGE}_1$  防止细



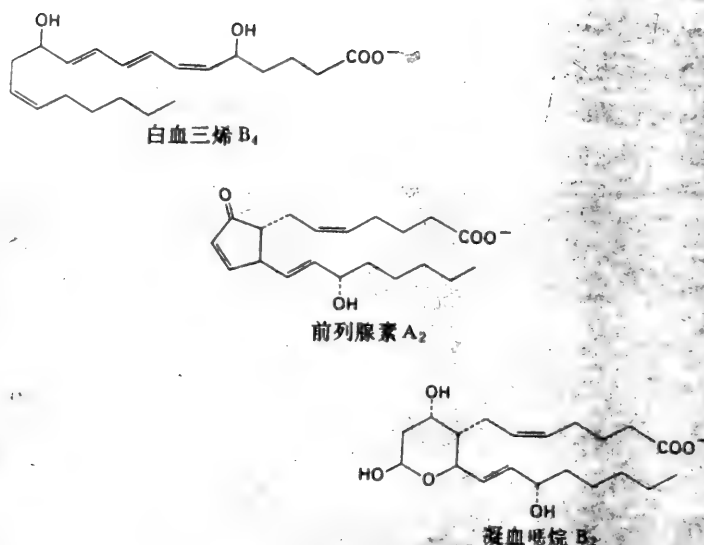


图 38-24 类花生酸类 (eicosanoids) 的结构。

胞内环式 AMP 水平的增高,而这种增高是由这些激素引起的。不过,  $\text{PGE}_1$  并不抑制由于加入二丁酰环式 AMP 而引起的脂肪水解。二丁酰环式 AMP 是环式 AMP 的类似物,易于穿过质膜。因此,  $\text{PGE}_1$  抑制脂肪细胞中的腺苷酸环化酶。在某些别的细胞中,前列腺素促进腺苷酸环化酶。前列腺素的其他效应是刺激发炎,调节进入特定器官中的血流,控制离子的跨膜转运,以及调节突轴的传递。

### 阿司匹灵使环氧合酶乙酰化而抑制前列腺素的合成

前列腺素的直接前体是在膜中由至少有 3 个双键的  $\text{C}_{20}$  脂肪酸合成的。这些多烯脂肪酸是哺乳动物的膳食中所必需的。前列腺素的前体是由磷脂酶从膜中的磷脂释放出来的。例如,  $\text{PGE}_2$  的生物合成从花生四烯酸开始,这种酸有 4 个双键。形成了一个环戊烷环,并且由前列腺素合酶的环氧合酶 (cyclooxygenase) 组分引入了 4 个氧原子。所有这些氧原子都是由分子态氧被引入前列腺素的 (图 38-25)。此合酶的氢过氧化酶组分催化 15-氢过氧基到 15-羟基的二电子还原反应。催化这些反应的含有血红素的二氧合酶 (dioxygenase) 是结合在光滑内质网上的。

韦恩 (J. Vane) 发现阿司匹灵通过钝化前列腺素合酶而抑制前列腺素的生物合成。具体地说,阿司匹灵 (乙酰水杨酸) 抑制此酶的环氧合酶活性,因为它乙酰化这一亚基的末端氨基 (图 38-26)。前列腺素促进发炎效应,而阿司匹灵却使之减弱。阿司匹灵是强有力的抗发炎药剂,因为它阻断前列腺素合成中的第一步。

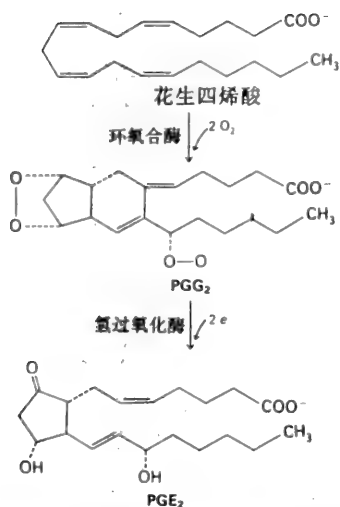


图 38-25 从花生四烯酸合成 PGE<sub>2</sub>。前列腺素合酶是催化这些反应的酶，它有环氧合酶和氢过氧化酶两个组分。

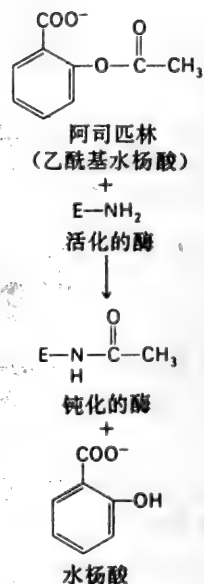


图 38-26 阿司匹灵钝化前列腺合酶的环境合酶组分。

## 胰岛素开动其受体的酪氨酸激酶活性

胰岛素与靶细胞质膜中的受体结合而起作用。它结合得很牢——激素-受体复合物的离解常数为0.1nM。受体对胰岛素的高亲和力是必要的，因为血液中胰岛素的浓度不高，为0.1nM范围。受体的首次纯化是困难的，因为它存在的密度很低，脂肪细胞的每平方微米质膜上大约有一个受体，这相当于每10<sup>6</sup>个磷脂分子有一个受体。向质膜制剂中加入非离子型去污剂使受体溶解下来，然后用亲和层析法提纯，层析柱上有共价连结的胰岛素。丘阿特里卡萨斯(P. Cuatrecasas)用这种方法成功地将胰岛素受体纯化了250,000倍。从500g匀浆中的蛋白质可得到1mg纯受体，匀浆则得自200只大鼠的肝脏。

纯化的胰岛素受体所产生的胰蛋白酶肽的顺序分析导致寡核苷酸探针的合成及其cDNA的克隆。胰岛素受体是一种膜本体的糖蛋白，由两个α链(135kd)和两个β链(95kd)组成，其间由3个二硫键联结起来。(每一αβ单位中一个二硫键，两个α链之间一个)。α链在膜的胞外侧，而β链则跨膜。受体的每一αβ单位是由1382个残基的单链前体衍生而来的。前体开始于一个信号顺序(已被酶切掉)，然后是α亚基的顺序，一个强碱性的四肽，再后是β亚基的顺序。把α和β亚基分隔开的精-赖-精-精顺序为一种起加工作用的蛋白酶所识别。

活化的胰岛素受体是一种酶——它催化靶子蛋白中酪氨酸残基的磷酸化。受体的酪氨酸激酶结构域位于β链的胞液部分。胰岛素的结合部位在α链上，在膜的胞外侧。胰岛素的结合使受体开动其酪氨酸激酶活性。然后活化的受体将同一链上的作为催化部位的2个酪氨酸残基磷酸化。自动磷酸化作用增加了它使靶子蛋白上的酪氨酸残基磷酸化的能力。自动磷酸

化作用的另一关键性的后果是，即使胰岛素解离而与受体分开，激酶活性也开动起来了。蛋白质激酶 A（由环式 AMP 级联反应活化）和蛋白质激酶 C（由磷酸肌醇酸级联反应活化）对丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化会降低受体的酪氨酸激酶活性。这些事实提出了许多引人入胜的问题：胰岛素结合在受体的胞外侧怎样引起胞液侧的酪氨酸激酶活性？活化的受体使哪种蛋白质磷酸化，而它们的磷酸化又怎样会有多种的代谢的和促进生长的效应？胰岛素除诱导酪氨酸激酶的活性外还做什么？环式 AMP 级联反应，磷酸肌醇酸级联反应和酪氨酸级联反应如何相互作用？

## 第 39 章 可兴奋膜和感觉系统

### 接受甲基的趋化性蛋白传递向化信号使穿过质膜

趋化性起始于化学物质结合到细胞表面的专一的**感化器** (chemosensor) 上, 然后关于吸引剂和拒斥剂存在的信息再由**转换器** (transducer) 传过质膜。假定有一种**翻跟头的调节器** (tumble regulator) 把信号从这些转换器带到鞭毛运动器 (flagellar motor) 的开关上, 这种运动器决定鞭毛是顺时针、还是逆时针旋转。

跨膜的信号传递是以名为接受甲基的趋化性蛋白类 (MCPs, methyl-accepting chemotaxis proteins) 为媒介的, 因为它们会被可逆地甲基化, 这即将讨论到。拒斥剂和某些吸引剂直接与 MCP 类结合, 而其它的吸引剂则与可溶性的感化器结合, 而后感化器再与 MCPs 结合 (图 39-7)。已知 4 种同源的 MCP: 它们是由 *tsr* (I)、*tar* (II)、*trg* (III) 和 *tap* (IV) 这 4 种基因编码的。例如, 天冬氨酸直接结合到 MCP II 上。另一方面, 麦芽糖则与一种麦芽糖结合蛋白结合, 这种蛋白存在于周质空间中; 这种复合物再与 MCP II 结合。麦芽糖结合蛋白还有另一种作用: 它把双糖传递给一种膜转运体。事实上, 每一种可溶的感化器也是某种养分的膜转运系统的一个组分。

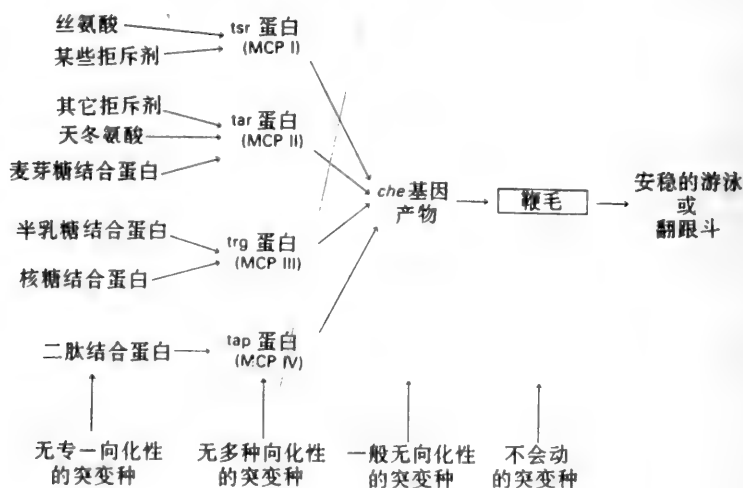


图 39-7 细菌趋化性中的信息流。

已分离出的各种类型的突变种列在表下方, MCP 代表接受甲基的趋化性蛋白。

[据 M. S. Springer, M. F. Coy and J. Adler, *Nature* 280 (1979): 279.]

MCP 类转换器的 4 个成员中的每一个质量约 60kd, 并含有 4 个区域: (1) 周质 (periplasmic) 结构域, 它与吸引剂或拒斥剂 (或吸引剂-蛋白质复合物) 结合; (2) 跨膜片段,

由 2 个  $\alpha$ -螺旋组成；(3) 胞液区，它与翻跟头的调节器相互作用；(4) 能发生可逆的甲基化的胞液区。MCP 类的胞液结构域是高度保守的，因为它们与信号加工系统的同样组分相互作用。例如，MCP I 和 II 的胞液结构域中一个 48 残基的顺序就是相同的。反之，它们的周质结构域则是多种多样的，因为它们要结合不同的吸引剂、拒斥剂或感化器蛋白。通常为 MCP II 所感受的吸引剂能引发一种嵌合 MCP 的形成，这种 MCP 是由 II 的氨基末端那一半和 I 的羧基末端那一半嵌合而成的。因此，似乎可能的是，不同的 MCP 以实质上相同的方式把信号传过膜。

每一种 MCP 的几个谷氨酸侧链可逆地被转甲基酶所甲基化，此酶利用 S-腺苷甲硫氨酸为甲基的供体。此酶使这些 MCP 的  $\alpha$  螺旋中谷-谷-X-X-丙-丝和谷-谷-X-X-丙-苏顺序中第二个谷氨酸被甲基化。MCP 上的这些  $\gamma$ -甲基由甲酯酶的水解作用而被除去。一种 MCP 的甲基化程度因吸引剂而增高，因拒斥剂而减少。与未甲基化的 MCP 相比，甲基化的 MCP 较难被吸引剂所引发，而较易被拒斥剂所引发。可逆的甲基化作用使得细菌的趋化器官像视觉系统和其他感觉系统一样，反应于刺激强度的变化，而不是其绝对水平。这种调节过程称为适应。

把鞭毛丝贴在玻璃表面上，可以监测一单个鞭毛运动器的输出。细胞长起来，平均每个有一条鞭毛，然后用吸附在载玻片上的抗鞭毛蛋白的抗体处理这些细胞。当鞭毛被固定得不动时，鞭毛运动器就会使整个细菌细胞旋转。顺时针方向 (CW) 和逆时针方向 (CCW) 旋转之间的变换很易在显微镜下观察到，并可用光电设备自动记录下来，这种设备追踪旋转着的细胞的影像。CCW 旋转的结果通常是安稳的游泳，这种旋转的几率由于把细菌放在吸引剂（如天冬氨酸）的浓度瞬时增高的情况下而增大。反之，暂时加入拒斥剂，如苯甲酸，则显著地增加 CW 旋转的几率，通常这导致翻跟头。长期增加吸引剂水平的影响也非常说明问题。在逐步增高其浓度的一秒钟之内，CCW 旋转的几率增加，但以后很快就回到本底数值。换言之，此系统已适应于较高水平的吸引剂；它现在期望更高。

实质上，细菌比较的是一秒钟前和两秒钟前所感觉到的吸引剂和拒斥剂的浓度，并通过这种比较决定是否翻跟头，由改变顺时针旋转和逆时针旋转的几率来做决定。趋化性系统把信号高度放大了。存在于细胞表面的 600 个受体分子中有一个与吸引剂结合，就会在瞬间使 CCW 旋转的几率增加 0.1。

## 鞭毛转动的开关以 che 基因所编码的中央加工系统为媒介

遗传分析揭示，MCP 类通过共同的加工系统决定着鞭毛转动的方向，此系为 che 基因所编码。已鉴定出 8 个 che 座位：A、B、C、D、W、R、Y 和 Z。这些基因的突变损害对于所有吸引剂和拒斥剂的向化性，而与 MCP 的突变不同，它仅阻断对于一组药剂的反应（见图 III-39-7）。基因 che R 编码转甲基酶，che B 编码甲酯酶。缺乏 che R 和 che B 两者的突变种仍能进行向化运动，但只是需要吸引剂或拒斥剂的浓度达到一定限度以上。在这些双突变种中，适应受到严重的损害，表明可逆的甲基化作用是适应作用的核心问题。仅损失 che B 则导致持续性的翻跟头，这种细菌一直改变着运动的方向，进行真正随机的运动，永远不会到达什么地方；反之，丢失 che R 基因则导致持续性的宁静的游泳，这种细菌就像堪戴德 (Candide) 一样，永远乐观，相信它面对的就是正确的方向。

在 che Y 的表达比正常水平高得多的突变种中, 运动器仅以 CW 方向旋转。完全缺乏胞液的 che 基因产物的细胞外膜上的鞭毛只进行 CCW 旋转。向这些外膜中加入微摩尔量的 che Y (14kd) 导致 CW 旋转。因此, 看来鞭毛旋转的方向是由 che Y 蛋白控制的。che Z 与 che Y 作用对抗, 但 che Z 不能开动运动器。鞭毛运动器的可逆的旋转也需要 che A 和 che W; 它们可能通过 che Y 而作为开动的媒介。从这些遗传学和生物化学的研究所得到的结论是: che Y 的活化形式启动 CW 旋转 (翻跟头)。che Y 的活化需要 ATP。MCP 是否活化 che Y 决定于 3 个因素。拒斥剂结合在 MCP 上以及 MCP 的甲基化增加 che Y 被活化的几率。反之, 吸引剂结合在 MCP 上则降低 che Y 被活化的可能性。明显的是 MCP 类本身既是微型的信息整合器 (integrator), 又是跨膜的信号器 (signaler)。目前的挑战是测定 che Y 的活化状态和钝化状态的分子本质。

### 在脂类双分子层中重建的纯化的钠通道有功能活性

电鳗 (Electrophorus electricus) 的发电器官是钠通道的极好来源。发电器官是由名为发电丝 (electroplax) 的成行的细胞组成的。细胞的一侧 (名为有神经的一侧, innervated face) 接受神经末端, 并且是可被电兴奋的。另一侧, 称为无神经的一侧, 是高度折叠的, 而且是不能被电兴奋的。被刺激的发电丝所产生的电压来源于这两侧的不对称的反应。兴奋时有神经的一侧, 其膜电位由  $-90\text{mV}$  变为  $+60\text{mV}$ ; 而无神经的一侧一直是  $-90\text{mV}$ 。结果, 在作用电位的高峰, 两个面外侧之间的电位差为  $150\text{mV}$ 。在发电器官中的发电小柱是串联的, 因此其电位可以加合。含有 5000 条发电丝的器官因此可以产生  $750\text{V}$  的放电。电鳗的发电丝来自肌肉细胞。它们保留了肌肉外膜的电兴奋性, 但失去了收缩的器具。

还利用纯化的  $\text{Na}^+$  通道研究了河豚毒素的专一结合。将去利通 (triton) X-100 (非离子型去污剂) 加于完整膜中, 以使电兴奋膜中的膜本体蛋白溶解。用离子交换层析法, 然后以固相化的卵磷脂柱进行亲和层析, 最后用蔗糖密度沉降法将  $\text{Na}^+$  通道与其他蛋白质分开。从大鼠脑中制得的  $\text{Na}^+$  通道由  $270\text{kd}$  的  $\alpha$  链、 $39\text{kd}$  的  $\beta_1$  链和  $37\text{kd}$  的  $\beta_2$  链组成。从电鳗的发电器官制得的  $\text{Na}^+$  通道则由单独的  $270\text{kd}$  的多肽链组成。

在脂类双分子层中重组的纯化的  $\text{Na}^+$  通道的通透特性与在天然膜中的这种通道的通透特性类似。重组的  $\text{Na}^+$  通道对  $\text{Na}^+$  有选择性, 它对  $\text{Na}^+$  的亲合性是对  $\text{K}^+$  的 8 倍。通道的开放对电压有很大的依赖性, 说明关闭状态与开放状态之间的转变与电荷部分地或完全地通过脂质层有关。这种依赖于电压的转变的平衡常数  $K$  如下式:

$$K = \frac{[\text{关闭的}]}{[\text{开放的}]} = e^{-zF(V-V_0)/RT}$$

式中  $V$  为膜电位,  $V_0$  为通道一半开放时的电压,  $z$  为在转变时通过膜而移动的电荷数,  $F$  为法拉第常数,  $R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度。于是通道的开放部分  $f$  如下式:

$$f_{\text{开放}} = \frac{1}{1 + e^{-zF(V-V_0)/RT}}$$

所观察到的  $f$  对  $V$  的依赖性表明, 重组通道的  $z$  为 4, 天然通道的为 4 至 6。

将河豚毒素施于胞外侧, 则重组的通道就被阻断。它们也会发生钝化作用, 这是天然通道的关键特性 (图 III-39-17)。由膜的去极化所引起的开放形式只能在约 1 毫秒之内让  $\text{Na}^+$

通过，它自动地转变为一种不能再被活化的关闭形式。膜再极化（由于  $K^+$  通过钾通道而流过）后钝化的状态，即转为一种关闭的、但可被活化的形式。迅速的钝化是产生神经脉冲所必需的。就好像音乐中一样，休止符和音符一样重要。藜芦碱（*veratridine*，百合科植物的一种固醇类生物碱）和树蛙毒素（*batrachotoxin*，有毒的哥伦比亚树蛙皮肤上的一种固醇类生物碱）专一地与此通道的开放状态结合，而阻断其钝化作用。

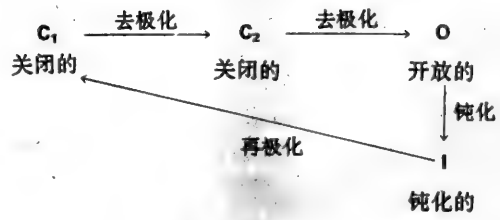


图 III-39-17  $Na^+$  通道的多个构象状态。

钠通道蛋白由 4 个重复的单位组成，它们跨越膜并形成一小孔

沼 (S. Numa) 及其同事对于  $Na^+$  通道的 cDNA 进行了克隆并测序，这些通道中 1 个是电鳗的发电器官的，还有 2 个是大鼠脑中不同的  $Na^+$  通道。这些研究证明， $Na^+$  通道的氨基酸顺序在很长的进化时期内一直是保守的。最有趣的是，他们揭示出：通道含有 4 个内部的重复片段，其氨基酸顺序相似。它们大概起源于基因的复制和多样化。疏水性特征表明，每一个同源的单位有 5 个疏水片段 (S1、S2、S3、S5、S6)。每一单位还有一个带很多正电荷的 S4 片段；几乎所有的第三个残基都是精氨酸或赖氨酸。沼提出，S1 到 S6 这 6 个片段都是跨膜的  $\alpha$ -螺旋，4 个 S2 螺旋的壁则形成小孔。S4 片段大概参与使通道对膜电压发生反应。S4 螺旋上带正电荷的侧链可能是与其它螺旋的带负电荷的螺旋配对的。膜的去极化可能是把 4 个这样的对偶中一个螺旋与另一个螺旋的相对位置偏移，因而使通道开放。

乙酰胆碱打开突触后膜中的阳离子大门

突触后膜或运动终板 (motor end plate) 的静止电位约为  $-75mV$ 。乙酰胆碱与专一受体的相互作用改变这些膜对离子的通透性。对  $Na^+$  和  $K^+$  的导度在 0.1 毫秒之内显著增加，而且大量的  $Na^+$  向内流和稍小量的  $K^+$  向外流。向内的  $Na^+$  流使突触后膜去极化，并引发邻近的轴突或肌肉膜中的动作电位。乙酰胆碱打开了单一的一种阳离子通道，这种通道对  $Na^+$  和  $K^+$  的通透性几乎是相等的。 $Na^+$  的流入量比  $K^+$  的流出量大得多，因为跨膜的电化学势梯度对于  $Na^+$  要陡得多。对离子通透性的这种变化是以烟酸乙酰胆碱受体为媒介的，为简便起见，我们称之为乙酰胆碱受体。蝇蕈碱酸 (muscarinic) 乙酰胆碱受体的设计和功能均不同。

点接触夹导度测量揭示出单个通道的活性

点接触夹技术 (patch-clamp technique) 使离子通道的研究革命化了，这种技术是奈尔 (E. Neher) 和萨克曼 (B. Sakmann) 于 1976 年发明的。将尖端直径约  $1\mu m$  的干净的玻璃吸液管压在完整的细胞上形成一个封口。轻吸就会形成一非常紧的封口，于是吸液管内部和外面的溶液之间的电阻为数千兆欧 (1 千兆欧为  $10^9$  欧姆)。这样，10 兆欧的封口 (称为千兆封口，gigaseal) 保证了流过吸液管的电流与流过为吸液管所盖住的膜的电流完全一样。当一已知电压



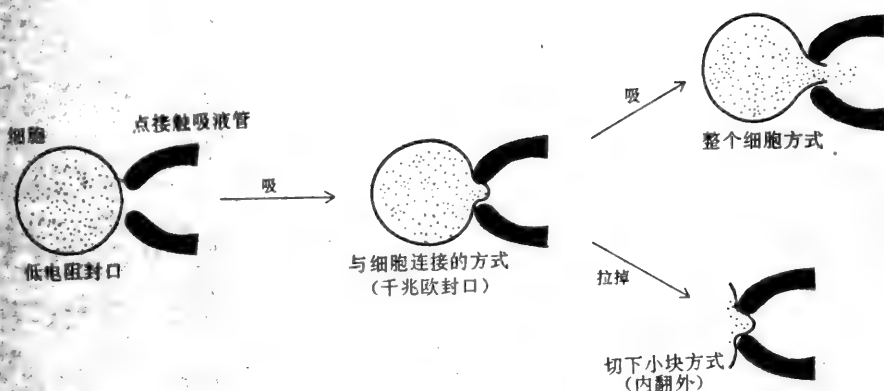


图 39-23 监测通道活性的点接触夹技术用途极为多种多样。

在吸液管与小块质膜之间形成高电阻封口(千兆封口)。这种结构称为**细胞连结**。加强吸力使小块膜破裂,即在吸液管与细胞内部之间产生一种低电阻的联结途径。用这种**整个细胞的方式**可以监测通道在整个质膜中的活动。以**切下小块的方式**(excised patch mode)制备膜时,将吸液管从细胞上拉开并带着一小块质膜,于是这块质膜的胞液侧就对着介质。用点接触吸液管就可监测这小块质膜。

被施于膜两面时,千兆封口使有可能以高分辨率进行电流的测量。事实上,点接触夹使这种测量的精确度增加了上百倍。现在可以微秒的时间分辨率直接监测通过一单个通道的离子流和一个通道在不同状态之间的转变。

骨骼肌的突触后膜中乙酰胆碱通道的点接触夹记录表明,加入乙酰胆碱之后就是通道的瞬时开放。当膜电位  $V$  为 -100 毫伏时,流过开放的通道的电流  $i$  为 3.5 微微安 (pA)。一安培为每秒钟流过  $6.24 \times 10^{18}$  个电荷。因此,流过通道的是每秒  $2.2 \times 10^7$  个离子。通道的导电度  $g$  等于  $i/V$ ,  $g$  以西门子单位 (siemens, 欧姆的倒数) 表示,  $i$  的单位为安培,  $V$  为伏特。电压 100 毫伏下, 3.5 微微安的电流相当于 35 微微西门子 (pS) 的导电。

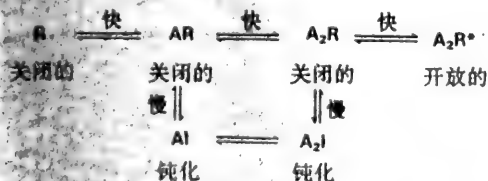


图 39-25 乙酰胆碱受体的多种构象状态。

所用缩写为: A, 乙酰胆碱; R, 受体的关闭状态, 但可被活化; R\*, 开放状态; I, 钝化状态。

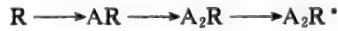
在状态, 一个是关闭的  $A_2R$  状态, 一个是开放的  $A_2R^*$  状态。当开放的  $A_2R^*$  状态转变为关闭的  $A_2R$  状态时, 其间有一空隙时间。当  $A_2R$  又变回为  $A_2R^*$  时, 通道又开放了。这种反复的变动比乙酰胆碱从  $A_2R$  上解离而形成 AR 或 R 形式快, AR 或 R 在乙酰胆碱没有结合上去时是

乙酰胆碱受体通道有 2 个不相互作用的乙酰胆碱结合部位。只有当 2 个部位均为乙酰胆碱所占据时, 通道才开放。单个通道活动的记录指明, 数次连续的开放成为一组 (称为一次释放), 每次释放的时间为数百微秒。每次释放与下次释放之间, 隔着一个长得多的关闭时间。一次释放之内的间隙为数十微秒。这些数据的最简单的解释是: 与配体结合的受体至少有 2 种存在



不能开放的。

经过一短时期的活动以后，与配体结合的受体变成钝化的，正如钠通道由于去极化而被开放后变得无活性一样。迅速关闭是几乎所有的信号转变系统的特性。这种脱敏作用 (desensitization) 是可逆的。在乙酰胆碱酯酶作用下乙酰胆碱的浓度由 0.3mM 降到 10nM 之后，受体又恢复其开放的能力。赫斯 (G. Hess) 曾研究脱敏作用和恢复的动力学。他进行了阳离子进入含有受体的囊泡的毫秒动力学研究。这些测量指出还存在有两种关闭的状态，A<sub>1</sub>I 和 A<sub>2</sub>I，它们比 A<sub>1</sub>R 和 A<sub>2</sub>R 稳定，而且对乙酰胆碱的亲合力很大。但无论如何，当突触裂缝中乙酰胆碱的浓度突然由于囊泡的释放而增高时，转变的顺序如下：



通道先进入开放的 A<sub>2</sub>R\* 形式，因为 A<sub>1</sub>R 到 A<sub>2</sub>I 的转变需要数百毫秒，而另一步骤则只要 1 毫秒或更短时间。因此，通道就是这样设计的，先开放，然后在有一乙酰胆碱脉冲之后自动关闭。

### 乙酰胆碱受体通道是由 5 个同源的跨膜多肽形成的

电鳐 (Torpedo) 是一种电鱼，其放电器官曾被选用作为乙酰胆碱受体的来源。这种放电器官的发电丝中胆碱能的突触后膜 (cholinergic postsynaptic membrane) 很多。另一种来自异国的生物学材料在分离乙酰胆碱受体方面也很有价值。蛇的神经毒素，例如来自一种台湾产蛇口涎中的 α-银环蛇毒素以及眼镜蛇毒素，都阻断神经肌肉传递。这些小的碱性蛋白质 (7kd) 专一地与乙酰胆碱受体结合。用 <sup>125</sup>I 碘化它们，或是使它们与吡哆醛磷酸形成希夫碱然后用 <sup>3</sup>H-氢化硼还原，即可使它们具有很强的放射活性。标记的眼镜蛇毒素与乙酰胆碱受体结合得很牢固，其解离常数为 10<sup>-9</sup>M。最为重要的是，它与后突触膜中的其他大分子基本上不结合。这样，可以用放射性标记物专一地标记乙酰胆碱受体。

加入非离子型去污剂于后突触膜的制剂中，可以将放电器官中的乙酰胆碱受体溶解下来，利用一含有共价结合的眼镜蛇毒素的柱进行亲和层析，可将此受体纯化。这种 268kd 的受体是 4 种亚基的五聚体，即 α<sub>2</sub>βγδ。每条 α 链有一乙酰胆碱的结合部位。这些亚基 (50—58kd) 的 cDNA 的克隆和测序证明它们有类似的顺序。每条链有 4 个主要的疏水片段，这些片段是跨膜的。小孔的壁大概是由这些跨膜片段所提供的亲水残基所形成的。很可能 4 种亚基的基因来自于一种祖先基因的复制和多样化。

安温 (N. Unwin) 最近以 25 Å 的分辨率阐明了电鳐的放电器官中乙酰胆碱受体的结构。它的三维电子结晶学分析证明此受体的 5 个亚基是围绕其中心轴而有规则地排列着的，其结构大约是五角形对称的 (pentagonal symmetry)，与组成它的 5 个亚基的同源特点一致。受体成圆柱形，平均直径约 65 Å。它由 5 个杆状的单位组成，每个单位长约 140 Å。受体在膜的突触一侧伸出约 70 Å，在胞液侧伸出约 30 Å。在受体的突触表面上，通道的空腔很宽，大约为 22 Å。在靠近双分子层中部处，它急速变窄，而到了细胞质一面上则不能分辨了；受体的这种形式就是封闭的，但可被活化的状态。迫切需要的是开放形式和去敏化形式的影像和高分辨率的图像。

## 为乙酰胆碱受体的亚基编码的 mRNA，经显微注射到爪蟾卵母细胞之中后可以表达

乙酰胆碱受体亚基 cDNA 的克隆，导致了研究这些通道如何起作用这一问题的新途径。从这些 cDNA 在体外转录而得到的 mRNA，可用显微注射法引入到爪蟾的卵母细胞中去，这种细胞没有它自己的乙酰胆碱受体。由这些注入的 mRNA 所翻译出来的多肽链被送到卵母细胞的质膜中去，然后用点接触夹的方法进行测定，以查明是否形成一功能性的乙酰胆碱受体。沼 (Numa) 已经发现，只有当 4 种亚基均被表达时，才能形成有充分活性的通道。假如没有  $\gamma$  或  $\delta$  链，组装成的就是有部分活性的通道；在形成五角形通道时，这两条链中的一种大概能代替另一种。卵母细胞表达系统也曾用以试验定位突变的效果。对于了解离子通道的结构和功能的关系，这种研究方法开创了新的途径。

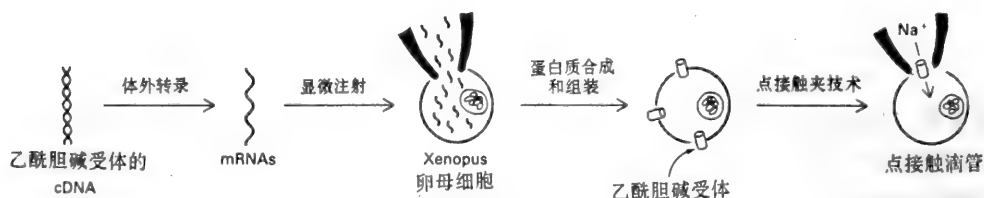


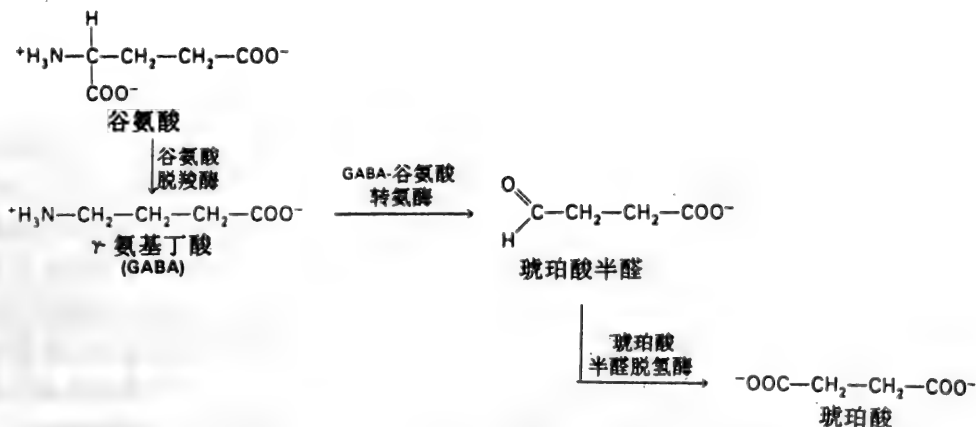
图 III-39-28 爪蟾的卵母细胞可用来表达由 cDNA 得到的 mRNA。

表达的步骤是：cDNA 的体外转录，所得到的 mRNA 的显微注射，卵母细胞对 mRNA 的翻译。将乙酰胆碱受体的 4 种亚基的 mRNA 进行显微注射，能形成功能性的通道，已为点接触夹法测量膜的电导所证明。

## 甘氨酸的 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 打开氯离子通道

甘氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 增加后突触膜对氯离子的通透性。对氯离子导度的增加导致膜的**过极化** (hyperpolarization)，它增高了引发一种作用电位所需的阈值。在中枢神经系统中甘氨酸和 GABA 起着抑制性递质 (inhibitory transmitter) 的作用。 $\gamma$ -氨基丁酸是由谷氨酸的脱羧形成的，此反应由谷氨酸脱羧酶催化 (图 III-39-36)。如所预期，吡哆醛磷酸是这种脱羧酶的辅基。 $\gamma$ -氨基丁酸经转氨作用变为琥珀酰半醛则失去活性，琥珀酰半醛然后被氧化为琥珀酸。

脑中的 GABA 受体为  $\alpha_2\beta_2$  四聚体。53kd 的  $\alpha$  亚基有一结合部位是结合巴比妥盐和影响中枢神经系统的其他药物的。57kd 的  $\beta$  亚基则结合 GABA。这些链的 cDNA 最近已被克隆，并测序。其疏水性特征表明每一亚基有 4 个跨膜螺旋。直径为 6 Å 的小孔是由 4 个亚基中的每个亚基至少提供一个螺旋、再合到一起而形成的。在小孔的每一端都有带正电荷的侧链聚到一起，这就使得此通道对阴离子有高度的选择性。甘氨酸受体也有类似结构。其结合马钱子碱的亚基与 GABA 受体的亚基极为相似。其次，甘氨酸活化的通道的这种亚基和 GABA 受体的两种



图Ⅲ-39-36 γ-氨基丁酸 (GABA) 的合成和钝化。

亚基均与烟碱酸乙酰胆碱受体有 25% 的顺序是完全相同的。所以，正在出现一个离子通道的超族 (superfamily)。

许多信号分子是由一种主要代谢物通过一单个步骤而形成的

由谷氨酸脱羧而合成 GABA 代表着一种重复出现的机理上的特点：许多信号分子是由主要的代谢中间产物经过一单独步骤而形成的 (表Ⅲ-39-2)。回想一下，许多激素作用的第二信使，环式 AMP，就是由 ATP 的环化作用而形成的。如前所述，多巴 (dopa) 和几种其他神经递质是由酪氨酸的降解而形成的。信号分子的另一个重复出现的特点，就是其合成和降解的可逆性。因此，可以精确地控制它们的浓度。像甘氨酸这样的主要代谢物在细胞之外可以起到神经递质的作用，但不能起细胞内信使的作用，因为不能在很大范围内调节其浓度，而又不使细胞的全面的秩序不被破坏。许多信号分子是代谢的副产品，是在进化过程中为了特殊目的而补充进来的，有些还有待发现。最近发现的果糖-2,6-双磷酸就是一例，它是代谢作用的关键性调节剂，是由糖酵解的主要中间产物磷酸化而形成的 (第 15 章)。

表Ⅲ-39-2 由代谢的主要中间产物一步形成的信号分子

前 体	信 号 分 子
ATP	环式 AMP
ATP	2',5'-寡腺苷酸类
GTP	环式 GMP
GTP	鸟苷四磷酸
谷氨酸	GABA
酪氨酸	多巴
胆碱	乙酰胆碱
花生四烯酸	前列腺素 PGE <sub>2</sub>
果糖-6-磷酸	果糖-2,6-双磷酸
1,3-双磷酸甘油酸	2,3-双磷酸甘油酸

## 视紫红质是一大类有 7 个跨膜螺旋的受体中的一员

视紫红质是有 7 个跨膜螺旋的 40kd 的酶本体蛋白(图 III-39-43)。氨基末端在膜的圆盘内侧(intradiscal side)，羧基末端在胞液侧。大约有一半蛋白质在膜的疏水核心之内，四分之一在圆盘内侧，另有四分之一在胞液侧。视紫红质在其氨基末端区有 2 个 N-连接的寡糖单位。11-顺-视黄醛的发色团在蛋白质的一个靠近膜中央的口袋中，其长轴几乎与膜的平面相平行。胞液侧有一区域，它把激发信号传递给一套酶促级联反应。有一交迭的区域参与已被激发的受体的去活化作用。羧基末端尾中丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化就是去活化作用中的一个步骤。视紫红质的 7 个螺旋的型式也在其他膜受体中出现。这一大类中的其他成员有锥细胞的光受体蛋白(本章后面)、 $\beta$ -肾上腺素功能药物的受体和蝇蕈碱酸乙酰胆碱受体。

视紫红质和所有其他膜本体蛋白一样，是由连在内质网上的核糖体合成的。新合成的蛋白质被转运到高尔基体中，然后再到质膜中。通过质膜的内陷，在外侧片段的基础上形成新的小圆盘(disc)，这说明视紫红质的糖单位在小圆盘内侧的事实，因为在质膜上它是面对胞外侧的。小圆盘之间的空间，像其他由膜包被着的区域的内部一样，在拓扑学上等于胞外的空间。

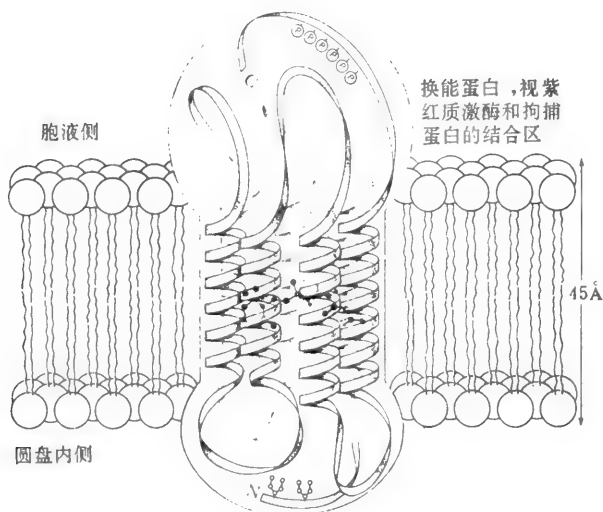
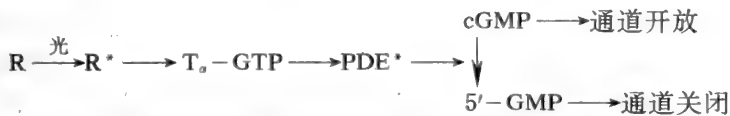


图 III-39-43 视紫红质模型。

这种跨膜受体的 7 个螺旋的特点也存在于其他感觉器受体和激素受体中。11-顺-视黄醛生色团在双分子层中央。位于圆盘内侧的氨基末端片段有 2 个 N-连接的寡糖单位。胞液侧的结构域将激发信号传递给换能蛋白(transducin)。羧基末端尾部中的多个丝氨酸和苏氨酸(有 P 作记号)的磷酸化使已被光激发的视紫红质去活化。[据 E. A. Dratz and P. A. Hargrave. *Trends Biochem. Sci.* 8(1983): 128, and L. Stryer. *Sci. Amer.* 255 (7): 42.]

## 光激发的视紫红质引发一级联反应导致高度放大的 GMP 的水解

质膜对  $\text{Na}^+$  的通透性的变化和由此而产生的过极化作用是外面的片段的高度放大的反应。暗适应的杆细胞吸收一个光子就可阻断百万个以上钠离子的流动。这种显著放大的机理是什么呢? 光激发的视紫红质引发一系列酶促级联反应, 其结果是环式 GMP 的水解。简言之, 在视觉兴奋中信息流是从光激发的视紫红质 ( $\text{R}^*$ ) 到换能蛋白 (transducin,  $\text{T}-\text{GTP}$ ), 再到活化的磷酸二酯酶 ( $\text{PDE}^*$ ), 此酶水解 GMP。光引起环式 GMP 浓度的降低, 然后就使质膜中对阳离子专一的通道关闭了。



换能蛋白是视觉兴奋中与信号偶联的蛋白质, 是 G-蛋白大类 (第 38 章) 中的一个成员。这种膜外周的蛋白质在钝化的 GDP 状态与活化的 GTP 状态之间反复转变。它由  $\alpha$  (39kd)、 $\beta$  (36kd) 和  $\gamma$  (8kd) 亚基组成, 与鸟嘌呤核苷酸结合的部位在  $\alpha$  亚基上。光激发的视紫红质与换能蛋白形成复合物, 从而使其活化, 并催化 GTP 与结合态 GDP 的交换。GTP 与换能蛋白的结合导致  $\text{R}^*$  的释放, 于是另一轮催化作用又开始。

由 GTP 的结合而引起的构象变化又引起  $\text{T}_\alpha\text{-GTP}$  从  $\text{T}_{\beta\gamma}$  上解离下来。 $\text{T}_\alpha\text{-GTP}$  是换能蛋白的活化形式, 它然后活化磷酸二酯酶, 此活化的酶迅速水解环式 GMP。



结合在  $\text{T}_\alpha$  上的 GTP 的水解使磷酸二酯酶去活化。换能蛋白的这个亚基本身就有 **GTP 酶活性**。返回到暗状态也要求  $\text{R}^*$  被去活化, 以便它不再继续催化换能蛋白的活化。**视紫红素激酶**在其羧基末端区的多个部位上催化  $\text{R}^*$  的磷酸化, 然后磷酸化的  $\text{R}^*$  与拘捕蛋白 (arrestin) 结合。拘捕蛋白是一种抑制性蛋白, 它阻断换能蛋白的结合。暗状态的恢复也需要环式 GMP 的合成, 此反应由**鸟苷酸环化酶**催化。



· 焦磷酸的水解推动这一反应向前进行。

光引发的环式 GMP 的级联反应有几个特点是值得注意的:

1. 一个光激发的视紫红质分子催化约 500 个换能蛋白分子的活化。活化的换能蛋白的形成是视觉兴奋中放大的**第一阶段**。

2. 磷酸二酯酶的催化活性在暗中为其本身的抑制性亚基所阻断。 $\text{T}_\alpha\text{-GTP}$  则将此抑制性亚基拉开, 从而活化此酶。活化的酶催化能力极强。它的转换数为  $4200 \text{ 秒}^{-1}$ ,  $K_{\text{cat}}/K_M$  值约为  $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ , 接近于扩散所控制的极限。**磷酸二酯酶对环式 GMP 的水解是放大的第二阶段**。

3. GTP 的水解给换能蛋白的循环供应能量。我们在这里看到利用  $\sim\text{P}$  来完成放大。

4. 环式 GMP 的级联反应像环式 AMP 的级联反应, 后者是像肾上腺素这样的激素发生作用的媒介。换能蛋白的结构和作用机理与刺激性 G 蛋白 (第 38 章) 的相像。这两种信号-偶

联蛋白都是被有 7 个螺旋特点的受体蛋白所活化的。它们的 GTP-GDP 循环也非常相似，它们都是通过解除抑制性结构域或亚基所施加的限制而开动效应剂酶。

## 视黄醛杆细胞的光敏通道以环式 GMP 的结合为大门

光引发的环式 GMP 的水解如何导致质膜中对阳离子专一的通道的关闭呢？答案来自于点接触夹的研究。将点电极放在杆细胞外面的一段上，并使其形成一千兆封口 (gigaseal)。然后将吸液管从细胞上拉开，一小片质膜就附着在吸管上。在完整细胞中曾是膜的胞液侧的一面现在对着外界溶液了。用微摩尔浓度的环式 GMP 可将膜上的通道打开，但未试验过别的核苷酸。这一实验证明环式 GMP 对通道的影响是直接的，而不是由于共价修饰或与胞液中一种蛋白质的结合。环式 GMP 开放通道的作用是高度协同的。希尔 (Hill) 系数为 3.0，表明通道的开放需要结合至少 3 个分子的环式 GMP。通道的高度协同性增加了它对环式 GMP 浓度微小变化的灵敏度。通道大概是多聚体，使阳离子通过的小孔位于其对称轴上，像乙酰胆碱受体通道中一样。

## 颜色视觉以 3 种光受体细胞为媒介

著名的托马斯·杨 (Thomas Young) 是一位临床医生、物理学教授和杰出的埃及古物学家。他证明了光的波动性，翻译了罗塞达石 (Rosetta Stone) 上的许多个象形文字。1802 年，杨提出颜色视觉是以 3 种基本受体为媒介的。150 多年以后用完整的网膜进行的分光光度的研究揭示出，确实有分别吸收蓝、绿、红光的 3 种类型的锥细胞。用直径仅为  $1\mu\text{m}$  的光线照射杆细胞，测量其中 3 种类型光受体色素的吸收光谱。不同的杆细胞对不同波长的单色光的反应表明，它们分属 3 类：有些蓝光激发最强，另一种是绿光，还有一种是红光。金鱼的 3 种颜色受体的吸收高峰为 455、530 和 625nm，而视紫红质的吸收高峰为 500nm。

所有三种锥细胞中的发色团都是 11-顺视黄醛。11-顺视黄醛的质子化的希夫碱在没有蛋白质存在时其吸收高峰为 440nm。视蛋白上的基团会改变与其结合的 11-顺视黄醛的吸收高峰的位置。把偶极子和带电荷的基团放在附近和扭曲多烯链，即可迅速使网膜上生色团的吸收高峰移动 100 纳米以上。生色团的吸收特性对其蛋白质环境的依赖性代表着一个普遍的原理：辅基的性质由它与蛋白质的相互作用所调节。另一个例子是血红素基团，它在血红蛋白中起氧载体的作用，在细胞色素 c 中起电子载体的作用，在过氧化物酶中起催化剂的作用。

锥细胞的光受体蛋白尚未被分离出来。不过，最近已克隆了它们的基因，并进行了测序。正如精神物理学和电生理的研究所预测的，人有 3 种锥细胞色素的基因——2 个在 X 染色体上密切连锁的基因编码吸收红光和吸收绿光的光受体蛋白，1 个在常染色体上的基因编码吸收蓝光的蛋白质。每一种锥细胞色素的氨基酸顺序中约有一半是与视紫红质的顺序相同的。吸收红光和吸收绿光的色素在 348 个残基中只有 15 个残基是不同的。很明显，锥细胞中的色素也像视紫红质一样，折叠成 7 个螺旋的结构。而且，锥细胞中能量转换的机理与杆细胞中的相似。锥细胞中的换能蛋白、磷酸二酯酶和环式 GMP 通道都与杆细胞中它们的伙伴很相似。

锥细胞色素的基因和视紫红素的基因大概起源于一个共同的祖先基因，此基因发生了复制和多样化。杆细胞色素与锥细胞色素的氨基酸顺序的差别说明，蓝色的锥细胞色素可能是首先出现的。它然后产生一长波长的色素，然后多样化而产生绿的和红的色素。注意到这一事实是有趣的：新大陆的猴子只有 2 种锥细胞色素（1 种蓝光的和 1 种长波光的），而旧大陆的猴子和人则有 3 种锥细胞色素。新大陆和旧大陆的猴子大约在三千万年以前分开。因此，灵长类的红的和绿的锥细胞色素是在较晚时期才出现的。

色盲的大多数形式是性联的隐性突变。约有 1% 的男子是红色盲，2% 是绿色盲。完整眼睛的光谱学测定已证明他们或是缺乏吸收红光的光受体分子，或是缺乏吸收绿光的光受体分子，或是有一种变态的色素，其吸收光谱发生了偏移。这样，色盲是由于锥细胞中的一种视蛋白缺乏或有缺陷。近年来关于色盲男人的 DNA 的分析表明，他们没有绿基因，或是有一种绿和红的杂合基因。杂合基因大概编码这样一种蛋白质：其光谱特性界于正常的吸收绿光和吸收红光的色素之间。红-绿色盲发生率之所以高，是因为这些非常近似的、密切连锁的基因的重组。在某些重组中，不均等的交换导致绿基因的丧失。有和多个绿基因发生的重组吗？诚然，有些人有 2 个、甚至 3 个并列的绿基因。他们的某些后代在几百万年以前可能有 4 种颜色视觉！

## 概 要

一单个光子就可以使一个网膜杆细胞兴奋。杆细胞的外面部分含有一叠约 1000 个小圆片，这是封闭的双层膜，以跨膜的蛋白质视紫红分子扎扎实实地堆叠起来的。光受体蛋白视紫红质的生色团是 11-顺视黄醛，它是由全反型视黄醇（维生素 A）衍生而来的。11-顺视黄醛与视蛋白的专一的赖氨酸残基形成希夫碱键。视紫红质是七螺旋族的膜受体中的一员，这些受体包括  $\beta$ -肾上腺素受体。视觉兴奋中的第一个过程是 11-顺视黄醛异构化为全反型。光激发的视紫红质 ( $R^*$ ) 引发一酶促级联反应，这又导致环式 GMP 的水解和随后的质膜中的对阳离子专一的通道的关闭。一单个光子阻断  $10^6$  以上  $Na^+$  离子的流入的结果，是质膜的过极化 (hyperpolarization)，这又传达给突轴。一单个  $R^*$  就会由于催化 GTP 与结合态 GDP 的交换而活化数百个转导蛋白 (transducin) 分子。然后转导蛋白的 GTP 形式活化一种对环式 GMP 专一的磷酸二酯酶，活化方式是解除一种抑制性的胁迫 (constraint)。颜色视觉是以三种光受体为媒介的，每种光受体均含有 11-顺视黄醛。事实上，锥细胞中的光受体与视紫红质非常相似。而且，锥细胞中作为视觉兴奋媒介的环式 GMP 级联反应也与杆细胞中的相似。脊椎动物光受体细胞中这种放大的级联反应与传递激素（如肾上腺素和胰高血糖素）作用的环式 AMP 级联反应极为相似。

## 选读文献 (第三版新增部分)

### 第 2 章

- Doolittle, R. F., 1985. Proteins. *Sci. Amer.* 253 (4) : 88—99. [重点在分子进化的透辟的概述.]
- Goldberg, M. E., 1985. The second translation of the genetic message : protein folding and assembly. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 388—391.
- Karplus, M., and McCammon I. A., 1986. The dynamics of proteins. *Sci. Amer.* 254 (4) : 42—51.
- Creighton, T. E., 1983. *Proteins; Structures and Molecular Principles*. W. H. Freeman.
- Fletterick, R. J., Schroer, T., and Matela, R. J., 1985. *Molecular Structure; acromolecules in Three-Dimensions*. Blackwell Scientific Publications. [关于分子模型的精采介绍.]
- Wold, F., 1981. In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification). *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 783—814.
- Chothia, C., 1984. Principles that determine the structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 537—572.
- Richardson, J. S., 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34 : 167—339. [晓畅易懂、插图精美的关于三维结构的论文, 重点是超二级结构的特点.]
- Harrison, S. C., and Durbin, R., 1985. Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 4028—4030. [在这篇精辟的论文中提出了蛋白质的折叠类似拼图玩具.]
- Kim, P. S., and Baldwin, R. L., 1982. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 459—490.
- Creighton, T. E., 1985. Energetics of protein structure and folding. *Biopolymers* 24 : 167—182.
- Freedman, R. B., Brockway, B. E., and Lambert, N., 1984. Protein disulphide-isomerase and the formation of native disulphide bonds. *Biochem. Soc. Trans.* 12 : 929—932.
- Kabsch, W., and Sander, C., 1983. How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Letters* 155 : 179—182.

### 第 3 章

- Hunkapiller, M. W., and Hood, L. E., 1983. Protein sequence analysis : automated microsequencing. *Science* 219 : 650—659.
- Merrifield, B., 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232 : 341—347.
- Creighton, T. E., 1983. *Proteins; structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman.
- Hirs, C. H. W., and Timasheff, S. N., (eds.), 1983. *Enzyme Structure, Part I. Methods in Enzymology*, vol. 91. Academic Press. [关于氨基酸分析、末端基团方法、化学和酶学裂解、肽的分离, 顺序分析、化学修饰和活力部位标记的权威论著的荟萃.]
- Scopes, R., 1982. *Protein Purification; principles and Practice*. Springer-Verlag.
- Langone, J. J., and Van Vunakis, H., 1983. *Immunochemical Techauques, Part A. Methods in Enzymology*, vol. 92. Academic Press.
- Freifelder, D., 1982. *Physical Biochemistry; Applications to Biochemistry and Molecular Biology*. W. H. Freeman. [其中有关于超速离心的精辟讨论.]
- Hunkapiller, M. W., Strickler, J. E., and Wilson, K. J., 1984. Contemporary methodology for protein structure determination. *Science* 226 : 304—311.



Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., and Dreyer, W. J., 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256 : 7990—7997.

Stein, S., and Udenfriend, S., 1984. A picomole protein and peptide chemistry; some applications to the opioid peptides. *Analy. Chem.* 136 : 7—23.

Doolittle, R. F., 1981. Similar amino acid sequences; chance or common ancestry? *J. Mol. Biol.* 16 : 9—16.

Lipman, D. J., and Pearson, W. R., 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227 : 1435—1441. [描述了一种数字算法, 可用以寻找某一种氨基酸顺序与前已测定的大量顺序资料之间的相似性. 此程序可用个人电脑进行.]

Wilson, A. C., 1985. The molecular basis of evolution. *Sci. Amer.* 253 (4) : 164.

Kline, A. D., Braun, W., and Wuthrich, K., 1986. Studies by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat. *J. Mol. Biol.* 189 : 377—382. [用 NMR 波谱法测定一种小蛋白质的三维结构. 这项重要的研究说明这种研究方法在阐明构象方面的威力.]

## 第 4 章

Felsenfeld, G., 1985. DNA. *Sci. Amer.* 253 (4) : 58—67.

Darnell, J. E., Jr., 1985. RNA. *Sci. Amer.* 253 (4) : 26—36. [也印在 *The Molecules of Life*. 上]

Dickerson, R. E., 1983. The DNA helix and how it is read. *Sci. Amer.* 249 (6) : 94—111.

Saenger, W., 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag. [关于核苷酸、DNA 和 RNA 三维结构的杰出高级读物. 有多幅精美插图.]

Dickerson, R. E., Drew, H. R., Conner, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V., and Kopka, M. L., 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216 : 475—485.

Kornberg, A., 1980. *DNA Replication*. W. H. Freeman. [杰出的可读性高的书. 亦可参看 1982 年的 *Supplement to DNA Replication*, 有新资料.]

McCarty, M., 1985. *The Transforming Principle; Discovering that Genes Are Made of DNA*. Norton.

## 第 5 章

Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D., 1986. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. [书中有关于真核生物中基因表达的精采论述.]

Lewin, B., 1987. *Genes* (3rd ed.). Wiley. [原核生物和真核生物中遗传信息流的透辟论述.]

Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., and Weiner, A. M., 1987. *Molecular Biology of the Gene* (4th ed.). Benjamin/Cummings. [这部杰作的第 I 卷讨论一般原理, 第 II 卷讨论真核系统.]

Gilbert, W., 1985. Genes-in-pieces revisited. *Science* 228 : 823—824.

Craik, C. S., Rutter, W. J., and Fletterick, R., 1983. Splice junctions : association with variation in protein structure. *Science* 220 : 1125—1129.

Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S., and Sharp, P. A., 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 1119.

Zaug, A. J., and Cech, T. R., 1986. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science* 231 : 470—475.

Altman, S., 1984. Aspects of biochemical catalysis. *Cell* 36 : 237—239.

Cech, T. R., and Bass, B. L., 1986. Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 599.

Wilson, A. C., 1985. The molecular basis of evolution. *Sci. Amer.* 253 (4) : 164.

Gilbert, W., 1986. The RNA world. *Nature* 319 : 618.

Lewin, R. , 1986. RNA catalysis gives fresh perspective on the origin of life. *Science* 231 : 545—546.  
Sharp, P. A. , 1985. On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42 : 397—400.  
Cech, T. R. , 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83 : 4360—4363.

Marchionni, M. , and Gilbert, W. , 1986. The triosephosphate isomerase gene from maize : introns antedate the plant-animal divergence. *Cell* 46 : 133—141.

## 第 6 章

- Berg, P. , 1981. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science* 213 : 296—303.  
Gilbert, W. , 1981. DNA sequencing and gene structure. *Science* 214 : 1305—1312.  
Sanger, F. , 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214 : 1205—1210.  
Watson, J. D. , Tooze, J. , and Kurtz, D. T. , 1983. *Recombinant DNA; A Short Course*. Scientific American Books. [可读性极高、明白易懂的引论.]  
Old, R. W. , and Primrose, S. B. , 1985. *Principles of Gene Manipulation; An Introduction to Genetic Engineering*. Blackwell Scientific Publications.  
Mantell, S. H. , Matthews, J. A. , and McKee, R. A. , 1985. *Principles of Plant Biotechnology; An Introduction to Genetic Engineering in Plants*. Blackwell Scientific Publications.  
Inouye, M. , (ed. ) , 1983. *Experimental Manipulation of Gene Expression*. Academic Press.  
Maniatis, T. , Fritsch, E. F. , and Sambrook, J. , 1982. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.  
Caruthers, M. H. , 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230 : 281—285.  
Itakura, K. , Rossi, J. J. , and Wallace, R. B. , 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 323—356.  
Hunkapiller, M. , Kent, S. , Caruthers, M. , Dreyer, W. , Firca, J. , Giffin, C. , Horvath, S. , Hunkapiller, T. , Tempst, P. , and Hood, L. , 1984. A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins. *Nature* 310 : 105—111.  
Smith, L. M. , Sanders, J. Z. , Kaiser, R. J. , Hughes, P. , Dodd, C. , Connell, C. R. , Heiner, C. , Kent, S. B. H. , and Hood, L. E. , 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 : 674—679.  
Cohen, S. N. , 1985. DNA cloning : historical perspectives. *Biogenetics of Neurohormonal Peptides*, pp. 3—14. Academic Press.  
Watson, J. D. , and Tooze, J. , 1981. *The DNA Story*. W. H. Freeman.  
Pestka, S. , 1983. The purification and manufacture of human interferons. *Sci. Amer.* 249 (2) : 36.  
Johnson, I. S. , 1983. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* 219 : 632—637.  
Brinster, R. L. , and Palmiter, R. D. , 1986. Introduction of genes into the germ lines of animals. *Harvey Lectures* 80 : 1—38. [本综述讨论了因注射生长激素的基因而产生体大的小鼠.]  
Karlsson, S. , Humphries, R. K. , Gluzman, Y. , and Nienhuis, A. W. , 1985. Transfer of genes into hematopoietic cells using recombinant DNA viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 158—162.  
Anderson, W. F. , 1984. Prospects for human gene therapy. *Science* 226 : 401—409.  
Cepko, C. L. , Roberts, B. E. , and Mulligan, R. C. , 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37 : 1053—1062.  
Friedman, R. L. , 1985. Expression of human adenosine deaminase using a transmissible murine retrovirus vector system. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 703—707.

- Chilton, M-D. , 1983. A vector for introducing new genes into plants. *Sci. Amer.* 248 (6) : 50.
- Hooikaas, P. J. J. , and Schilperoort, R. A. , 1985. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*; a natural genetic engineer. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 307—309.
- Fromm, M. E. , Taylor, L. P. , and Walbot, V. , 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319 : 791—793.
- Botstein, D. , and Shortle, D. , 1985. Strategies and applications of in vitro mutagenesis. *Science* 229 : 1193—1201.
- Myers, R. M. , Lerman, L. S. , and Maniatis, T. , 1985. A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments. *Science* 229 : 242—247.

## 第 7 章

- Dickerson, R. E. , and Geis, I. , 1983. *Hemoglobin; Structure, Function, Evolution and Pathology*. Benjamin/Cummings. [插图精美, 富于展望.]
- Fermi, G. , and Perutz, M. F. , 1981. *Atlas of Molecular Structures in Biology. 2. Haemoglobin and myoglobin*. Clarendon Press, Oxford.
- Shaanan, B. , 1983. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 171 : 31—59.
- Fermi, G. , Perutz, M. F. , Shaanan, B. , and Fourme, R. , 1984. The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 175 : 159—174.
- Ho, C. , (ed. ) , 1982. *Hemoglobin and Oxygen Binding*. Elsevier. Perutz, M. F. , 1980. Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 208 : 135—162.
- Gelin, B. R. , Lee, A. W. -M. , and Karplus, M. , 1983. Hemoglobin tertiary structure change on ligand binding; its role in the cooperative mechanism. *J. Mol. Biol.* 171 : 489—559.
- Friedman, J. M. , 1985. Structure, dynamics, and reactivity in hemoglobin. *Science* 228 : 1273—1280.
- Embury, S. H. , 1986. The clinical pathophysiology of sickle-cell disease. *Ann. Rev. Med.* 37 : 361—376.
- Noguchi, C. T. , and Schechter, A. N. , 1985. Sickle hemoglobin polymerization in solution and in cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 : 239—263.
- Embury, S. H. , Scharf, S. J. , Saiki, R. K. , Gholson, M. A. , Golbus, M. , Arnheim, N. , and Erlich, H. A. , 1987. Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. *New Eng. J. Med.* 316 : 656—661.
- Winslow, R. M. , and Anderson, W. F. , 1983. The hemoglobinopathies. In Stanbury, J. B. , Wyngaarden, J. B. , Fredrickson, D. S. , Goldstein, J. L. , and Brown, M. S. , (eds. ) , *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed. ) , pp. 1666—1710. McGraw-Hill.
- Kan, Y. W. , 1983. The thalassemias. In Stanbury, J. B. , Wyngaarden, J. B. , Fredrickson, D. S. , Goldstein, J. L. , and Brown, M. S. , (eds. ) , *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed. ) , pp. 1711—1725.
- Weatherall, D. J. , and Clegg, J. B. , 1982. Thalassemia revisited *Cell* 29 : 7—9.
- Orkin, S. H. , and Kazazian, H. H. , Jr. , 1984. The mutation and polymorphism of the human  $\beta$ -globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.* 18 : 131—171.
- Honig, G. R. , and Adams, J. G. , 1986. *Human Hemoglobin Genetics*. Springer-Verlag.
- Stamatoyannopoulos, G. , Niehaus, A. W. , Leder, P. , and Majerus, P. W. , (eds. ) , 1986. *Molecular Basis of Blood Diseases*. Saunders.
- Chang, J. C. , and Kan, Y. W. , 1982. A sensitive new prenatal test for sickle cell anemia. *New Engl. J. Med.* 307 : 30—32.
- Goosens, M. , Dumez, Y. , Kaplan, L. , Lupker, M. , Charbet, C. , Henrion, R. , and Rosa, J. , 1983.

Prenatal diagnosis of sickle-cell anemia in the first trimester of pregnancy. *New Engl. J. Med.* 309 : 831—833.

Saiki, R. K. , Scharf, S. , Faloona, F. , Mullis, K. B. , Horn, G. T. , Erlich, H. A. , and Arnheim, N. , 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350—1354.

Bunn, H. F. , and Forget, B. G. , 1986. *Hemoglobin; Molecular, Genetic and Clinical Aspects.* Saunders.

Go, M. , 1981. Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature* 291 : 90—92.

Craik, C. S. , Buchman, S. R. , and Beychok, S. , 1981. O<sub>2</sub> binding properties of the product of the central exon of beta-globin gene. *Nature* 291 : 87—90.

De Sanctis, G. , Falcioni, G. , Giardina, B. , Ascoli, F. , and Brunori, M. , 1986. Mini-myoglobin; preparation and reaction with oxygen and carbon monoxide. *J. Mol. Biol.* 188 : 73—76.

## 第 8 章

Cech, T. R. , 1986. RNA as an enzyme. *Sci. Amer.* 255 (5) : 64—75. [关于下列发现的精采论文,即 RNA 也像蛋白质一样,可能是有效的催化剂.]

Fersht, A. , 1983. *Enzyme Structure and Mechanism* (2nd ed. ). W. H. Freeman. [关于酶作用的简明透辟的导论,重点是物理原理.]

Bender, M. L. , Bergeron, R. J. , and Komiyama, M. , 1984. *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis.* Wiley—Interscience.

Dugas, H. , and Penney, C. , 1981. *Bioorganic Chemistry; A Chemical Approach to Enzyme Action.* Springer—Verlag.

Edsall, J. T. , and Gutfreund, H. , 1983. *Biothermodynamics; The Study of Biochemical Processes at Equilibrium.* Wiley.

Fersht, A. R. , Leatherbarrow, R. J. , and Wells, T. N. C. , 1986. Binding energy and catalysis; a lesson from protein engineering of the tyrosyl-tRNA synthetase. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 321—325.

Cheung, W. Y. , 1982. Calmodulin. *Sci. Amer.* 246 (6) : 62—70.

Neurath, H. , 1985. Proteolytic enzymes, past and present. *Fed. Proc.* 44 : 2907—2913.

Waxman, D. J. , and Strominger, J. L. , 1983. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 825—69.

Abraham, E. P. , 1981. The beta-lactam antibiotics. *Sci. Amer.* 244 : 76—86.

Walsh, C. T. , 1984. Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 493—535.

## 第 9 章

Neurath, H. , 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224 : 350—357.

Fersht, A. , 1985. *Enzyme Structure and Mechanism.* W. H. Freeman. [第 2 和 15 章中有关于催化机理的清晰的讨论.]

Zaug, A. J. , and Cech, T. R. , 1986. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science* 231 : 431—475.

Craik, C. S. , Largman, C. , Fletcher, T. , Rocznik, S. , Barr, P. J. , Fletterick, R. , and Rutter, W. J. , 1985. Redesigning trypsin; alteration of substrate specificity. *Science* 228 : 291—297.

Tramontano, A. , Janda, K. D. , and Lerner, R. A. , 1986. Catalytic antibodies. *Science* 234 : 1566—1570.

Pollack, S. J. , Jacobs, J. W. , and Schultz, P. G. , 1986. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* 234 : 1570—1573.

Weaver, L. H. , Grutter, M. G. , Remington, S. J. , Gray, T. M. , Isaacs, N. W. , and Mathews, B. W. , 1985. Comparison of goose - type, chicken - type, and phage - type lysozymes illustrates that changes occur in both amino acid sequence and three - dimensional structure during evolution. *J. Mol. Evol.* 21 : 97—111.

McPherson, A. , Brayer, G. , Cascio, D. , and Williams, R. , 1986. The mechanism of binding of a polynucleotide chain to pancreatic ribonuclease. *Science* 232 : 765—768.

Borah, B. , Chen, C. W. , Egan, W. , Miller, M. , Wlodawer, A. , and Cohen, J. S. , 1985. Nuclear magnetic resonance and neutron diffraction studies of the complex of ribonuclease A with uridine vanadate, a transition - state analogue. *Biochemistry* 24 : 2058—2067.

Lipscomb, W. N. , 1983. Structure and catalysis of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 17—34.

Christianson, D. W. , and Lipscomb, W. N. , 1987. The complex between carboxypeptidase A and a possible transition state analogue; mechanistic inferences from high resolution x - ray structures of enzyme - inhibitor complexes. *J. Amer. Chem. Soc.* 109 : 4998—5003.

Monzinger, A. F. , and Matthews, B. W. , 1984. Binding of N - carboxymethyl dipeptide inhibitors to thermolysin determined by x - ray crystallography; a novel class of transition - state analogues for zinc peptidases. *Biochemistry* 23 : 5724—5729.

Makinen, M. W. , Wells, G. B. , and Kang, S. O. , 1984. Structure and mechanism of carboxypeptidase A. *Advan. Inorg. Biochem.* 6 : 1—69.

Vallee, B. L. , and Galde, A. , 1984. The metallobiochemistry of zinc enzymes. *Advan. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 56 : 284—430. [关于锌在酶中作用的精辟论述.]

Sander, M. E. , and Witzel, H. , 1985. Direct chemical evidence for the mixed anhydride intermediate of carboxypeptidase A in ester and peptide hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132 : 681—687.

Gardell, S. J. , Craik, C. S. , Hilvert, D. , Urdea, M. S. , and Rutter, W. J. , 1985. Site - directed mutagenesis shows that tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis. *Nature* 317 : 551—555.

Steitz, T. A. , and Shulman, R. G. , 1982. Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Ann. Rev. Biochem. Biophys.* 11 : 419—444.

Kossiakoff, A. A. , and Spencer, S. A. , 1981. Direct determination of the protonation states of aspartic acid - 102 and histidine - 57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases; neutron structure of trypsin. *Biochemistry* 20 : 6462—6474.

Kamphuis, I. G. , Drenth, J. , and Baker, E. N. , 1985. Thiol proteases. Comparative studies based on the high - resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J. Mol. Biol.* 182 : 317—329.

Bradshaw, R. A. , and Tang, J. , (eds. ), 1985. *Molecular Architecture of Proteins and Enzymes*. Academic Press.

## 第 10 章

Kantrowitz, E. R. , Pastra-Landis, S. C. , and Lipscomb, W. N. , 1980. *E. coli* aspartate transcarbamylase. *Trends Biochem. Sci.* 5 : 124—128 and 150—153.

Neurath, H. , 1986. The versatility of proteolytic enzymes. *J. Cell. Biochem.* 32 : 35—49.

Doolittle, R. F. , 1981. Fibrinogen and fibrin. *Sci. Amer.* 245 (12) : 126—135.

Lawn, R. M. , and Vehar, G. A. , 1986. The molecular genetics of hemophilia. *Sci. Amer.* 254 (3) : 48—65.

Lahue, R. S., and Schachman, H. K., 1986. Communication between polypeptide chains in aspartate transcarbamoylase. Conformational changes at the active sites of unliganded chains resulting from ligand binding to other chains. *J. Biol. Chem.* 261 : 3079—3084.

Krause, K. L., Volz, K. W., and Lipscomb, W. N., 1985. Structure at 2.9-Å resolution of aspartate carbamoyltransferase complexed with the bisubstrate analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 1643—1647.

Volz, K. W., Krause, K. L., and Lipscomb, W. N., 1986. The binding of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate to aspartate carbamoyltransferase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 136 : 822—826.

Foote, J., and Schachman, H. K., 1985. Homotropic effects in aspartate transcarbamylase. What happens when the enzyme binds a single molecule of the bisubstrate analog N-phosphonacetyl-L-aspartate? *J. Mol. Biol.* 186 : 175—184.

Imai, K., 1983. The Monod-Wyman-Changeux allosteric model describes haemoglobin oxygenation with only one adjustable parameter. *J. Mol. Biol.* 167 : 741—749.

Bode, W., and Huber, R., 1986. Crystal structure of pancreatic serine endopeptidases. In Desnuelle, P., Sjöström, H., and Noren, O., (eds.), *Molecular and Cellular Basis of Digestion*, pp. 213—234. Elsevier. [三维结构和活化机理的精采论述.]

James, M. N. G., and Sielecki, A. R., 1986. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature* 319 : 33—38.

Davie, E. W., 1986. Introduction to the blood coagulation cascade and the cloning of blood coagulation factors. *J. Protein Chem.* 5 : 247—253.

McKee, P. A., 1983. Hemostasis and disorders of blood coagulation. In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), pp. 1531—1560. McGraw-Hill.

Gitschier, J., Wood, W. I., Shuman, M. A., and Lawn, R. M., 1986. Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science* 232 : 1415—1416.

Patthy, L., 1985. Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* 41 : 657—663.

Doolittle, R. F., 1984. Fibrinogen and fibrin. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 195—229.

Weisel, J. W., Stauffacher, C. V., Bullitt, E., Cohen, C., 1985. A model for fibrinogen: domains and sequences. *Science* 230 : 1386—1391.

Park, C. H., and Tulinsky, A., 1986. Three-dimensional structure of the Kringle sequence; structure of prothrombin fragment 1. *Biochemistry* 25 : 3977—3982.

Suttie, J. W., 1985. Vitamin K-dependent carboxylase. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 459—477.

Carrell, R., and Travis, J., 1985.  $\alpha_1$ -Antitrypsin and the serpins; variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 20—24.

Travis, J., and Salvesen, G. S., 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 655—709.

Gadek, J. E., and Crystal, R. G., 1983.  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency. In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), pp. 1450—1467. McGraw-Hill.

Carp, H., Miller, F., Hoidal, J. R., and Janoff, A., 1982. Potential mechanism of emphysema;  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79 : 2041—2045.

Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., and Carrell, R. W., 1983. Mutation of antitrypsin to antithrombin, *New Engl. J. Med.* 309 : 694—698. [情况报告和分子分析, 此情况是在  $\alpha_1$ -抗蛋白酶中诱导出甲硫氨酸变为精氨酸的突变, 此突变会引起致死的出血紊乱.]

## 第 11 章

Martin, G. R., Timpl, R., Muller, P. K., and Kühn, K., 1985. The genetically distinct collagens, *Trends Biochem. Sci.* 10 : 285—287.

Cheah, K. S. E., 1985. Collagen genes and inherited connective tissue disease. *Biochem. J.* 229 : 287—303.

Caplan, A. I., 1984. Cartilage. *Sci. Amer.* 251 (4) : 84—94. [有关于蛋白多糖的讨论.]

Hynes, R. O., 1986. Fibronectins. *Sci. Amer.* 254 (6) : 42—51.

Fleischmajer, R., Olsen, B. R., and Kühn, K., (eds.), 1985. *Biology, Chemistry, and Pathology of Collagen*, Vol. 260. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [有许多篇关于胶原结构、基因和遗传疾病的精采论文.]

Piez, K. A., and Reddi, A. H., 1984. *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier Science.

Hay, E. D., (ed.), 1982. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum.

Chu, M-L., de Wet, W., Bernard, M., Ding, J-F., Morabito, M., Myers, J., Williams, C., and Ramirez, F., 1984. Human pro- $\alpha 1$  (I) collagen gene structure reveals evolutionary conservation of a pattern of introns and exons. *Nature* 340 : 337—340.

Boedtker, H., Finer, M., and Aho, S., 1985. The structure of the chicken  $\alpha 2$  collagen gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 460 : 85—116.

Bornstein, P., Horlein, D., McPherson, J., Sandmeyer, S., and Gallis, B., 1982. Regulation of collagen biosynthesis. In Kühn, K., Schoene, H., and Timpl, R. (eds.), *New Trends in Basement Membrane Research*, Raven Press.

Hulmes, D. J. S., Bruns, R. R., and Gross, J., 1983. On the state of aggregation of newly secreted procollagen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80 : 388—392.

Eyre, D. R., Paz, M. A., and Gallop, P. M., 1984. Cross-linking in collagen and elastin, *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 717—748.

Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A., and Eizen, A. Z., 1986. Human fibroblast collagenase: Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J. Biol. Chem.* 261 : 6600—6605.

Sandberg, L. B., Soskel, N. T., and Leslie, J. G., 1981. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease state. *New Engl. J. Med.* 304 : 556—579.

Cleary, E. G., and Gibson, M. A., 1983. Elastin - associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 10 : 97—209.

Urry, D. W., 1983. What is elastin; what is not. *Ultrastruc. Pathol.* 4 : 227—251.

Hassell, J. R., Kimura, J. H., and Hascall, V. C., 1986. Proteoglycan core protein families. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 539.

Hook, M., Kjellen, L., Johansson, S., and Robinson, J., 1984. Cell - surface glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 847—869.

Hynes, R., 1985. Molecular biology of fibronectin. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 67—90.

Odermatt, E., Tamkun, J. W., and Hynes, R. O., 1985. Repeating modular structure of the fibronectin gene: relationship to protein structure and subunit variation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 6571—6575.

Engel, J., Odermatt, A., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rohde, H., and Timpl, R., 1981. Shapes, domain organization, and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular

matrix. *J. Mol. Biol.* 150 : 97—120.

Pinnell, S. R. , and Murad, S. , 1983. Disorders of collagen. In Stanbury, J. B. , Wyngaarden, J. B. , Fredrickson, D. S. , Goldstein, J. L. , and Brown, M. S. (eds. ), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed. ), pp. 1425—1449. McGraw-Hill.

Smith, R. , 1986. The molecular genetics of collagen disorders. *Clin. Sci.* 71 : 129—135.

Prockop, D. J. , and Kivirikko, K. I. , 1984. Heritable diseases of collagen. *New Engl. J. Med.* 311 : 376—386.

Cohn, D. H. , Byers, P. H. , Steinmann, B. , and Gelinas, R. E. , 1986. Lethal osteogenesis imperfecta resulting from a single nucleotide change in one human pro- $\alpha 1$  (I) collagen allele. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 6045—6047.

Minor, R. R. , Sippola-Thiele, M. , McKeon, J. , Berger, J. , and Prockop, D. J. , 1986. Defects in the processing of procollagen to collagen are demonstrable in cultured fibroblasts from patients with the Ehlers-Danlos and osteogenesis imperfecta syndromes. *J. Biol. Chem.* 261 : 10006—10014.

## 第 12 章

Bretscher, M. S. , 1985. The molecules of the cell membrane. *Sci. Amer.* 253 (4) : 100—108.

Unwin, N. , and Henderson, R. , 1984. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Amer.* 250 (2) : 78—94.

Vance, D. E. , and Vance, J. E. , (eds. ), 1985. *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Benjamin/Cummings. [有许多关于脂类结构、动态、代谢和组装成膜的精采论文.]

Racker, E. , 1985. *Reconstitutions of Transporters, Receptors, and Pathological States*. Academic Press. [一本令人心驰神往的个人关于膜组分的重建的著作,列有许多策略和实例.]

Houslay, M. D. , and Stanley, K. K. , 1982. *Dynamics of Biological Membranes*. Wiley. [关于膜的物理性质的精采著作.]

Robertson, R. N. , 1983. *The Lively Membranes*. Cambridge University Press. [可读性极高的入门读物,有许多脂类的插图.]

Yeagle, P. L. , 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 822 : 267—287.

Thompson, T. E. , and Tillack, T. W. , 1985. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 : 361—386.

Lis, H. , and Sharon, N. , 1986. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 35—67.

Elson, E. L. , 1986. Membrane dynamics studied by fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 40 : 367—383.

Marchesi, V. T. , 1985. The cytoskeletal system of red blood cells. *Hosp. Pract.* 20 (11) : 113—131.

Bennett, V. , 1985. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 273—304.

Marchesi, V. T. , 1985. Stabilizing infrastructure of cell membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 531—561.

Shohet, S. B. , and Lux, S. E. , 1984. The erythrocyte membrane skeleton: biochemistry and pathophysiology. *Hosp. Pract.* 19 (10) : 77—83 and 19 (11) : 89—108.

Shen, B. W. , Josephs, R. , and Steck, T. L. , 1986. Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 102 : 997—1006.

Byers, T. J. , and Branton, D. , 1985. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 6153—6157.

Kopito, R. R. , and Lodish, H. F. , 1985. Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein *Nature* 316 : 234—238.



Madden, T. D. , 1986. Current concepts in membrane protein reconstitution. *Chem. Phys. Lipids* 40 : 207—222.

Montal, M. , Darszon, A. , and Schindler, H. , 1981. Functional reassembly of membrane proteins in planar lipid bilayers. *Quart. Rev. Biophys.* 14 : 1—79.

Helenius, A. , Sarvas, M. , and Simons, K. , 1981. Asymmetric and symmetric membrane reconstitution by detergent elimination. *Eur. J. Biochem.* 116 : 27—31.

Ostro, M. J. , 1987. Liposomes. *Sci. Amer.* 256 (1) : 102—110. [讨论了脂质体在给药方面的可能应用.]

Eisenberg, D. , 1984. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 595—623.

Engelman, D. M. , Steitz, T. A. , and Goldman, A. , 1986. Identifying non-polar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 321—353.

Amos, L. A. , Henderson, R. , and Unwin, P. N. T. , 1982. Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals. *Prog. Biophys. & Molec. Biol.* 39 : 183—231.

Deisenhofer, J. , Epp, O. , Miki, N. , Huber, R. , and Michel, H. , 1984. X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3-Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 180 : 385—398.

## 第 13 章

Edsall, J. T. , and Gutfreund, H. , 1983. *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*. Wiley. [简明, 有许多极有教益的实例.]

Shulman, R. G. , 1983. NMR spectroscopy of living cells. *Sci. Amer.* 248 (1) : 86—93.

Radda, G. K. , 1986. The use of NMR spectroscopy for the understanding of disease. *Science* 233 : 640—645.

Gadian, D. G. , 1982. *Nuclear Magnetic Resonance and Its Applications to Living Systems*. Oxford University Press.

Jardetzky, O. , and Roberts, G. C. K. , 1981. *NMR in Molecular Biology*. Academic Press.

Chance, B. , 1983. A noninvasive biochemical assay and imaging of animal and human tissues by optical and nuclear magnetic resonance techniques. *Proc. Amer. Phil. Soc.* 127 : 1—25.

Avison, M. J. , Hetherington, H. P. , and Shulman, R. G. , 1986. Applications of NMR to studies of tissue metabolism. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 377.

Radda, G. K. , 1986. Control of bioenergetics : from cells to man by phosphorus NMR spectroscopy. *Biochem. Soc. Trans.* 14 : 517—525.

## 第 14 章

Steer, C. J. , and Ashwell, G. , 1986. Hepatic membrane receptors for glycoproteins. *Prog. Liver Dis.* 8 : 99—123.

Feizi, T. , and Childs, R. A. , 1985. Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation antigens, tumour-associated antigens and components of receptor systems. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 24—29.

Quijcho, F. A. , 1986. Carbohydrate-binding proteins : tertiary structures and protein-sugar interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 287—315.

Lis, H. , and Sharon, N. , 1986. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 35—67.

McNeil, M. , Darvill, A. G. , Fry, S. C. , and Albersheim, P. , 1984. Structure and function of the primary

cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 625—663.

Albersheim, P., and Darvill, A. G., 1985. Oligosaccharins. *Sci. Amer.* 253 (3) : 58—64. [植物细胞壁中的这些片段控制着诸如发育和抵御疾病这样一些功能.]

Ivatt, R. J. (ed.), 1984. *The Biology of Glycoproteins*. Plenum.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 631—664.

Barondes, S. H., 1984. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science* 223 : 1259—1264.

Cole, G. J., Loewy, A., and Glaser, L., 1986. Neuronal cell-cell adhesion depends on the interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature* 320 : 445—447.

Labat-Robert, J., Timpl, R., and Ladislas, R., (eds.), 1986. *Structural Glycoproteins in Cell-Matrix Interactions*. Karger.

Sweeley, C. C., and Nunez, H., 1985. Structural analysis of glycoconjugates by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 765—801.

Barker, R., and Serianni, A. S., 1986. Carbohydrates in solution: studies with stable isotopes. *Acc. Chem. Res.* 19 : 307—313. [关于 $^{13}\text{C}$  NMR 研究的综述.]

## 第 15 章

Boiteux, A., and Hess, B., 1981. Design of glycolysis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 293 : 5—22. [关于糖酵解调节的令人鼓舞的论文. 收集在名为“*The Enzymes of Glycolysis, Structure, Activity, and Evolution*.”的论文集中, 该文集包括 X 射线结晶学、酶学和进化生物学.]

Sols, A., 1981. Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Top. Cell. Regul.* 19 : 77—101. [关于代谢作用的变构调节的有趣的讨论, 重点是糖酵解的控制.]

Fothergill-Gilmore, L. A., 1986. The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 47—51.

Ochs, R. S., Hanson, R. W., and Hall, J., 1985. *Metabolic Regulation*. Elsevier. [收集了原发表在 *Trends in Biochemical Sciences (TIBS)* 中的论文. TIBS 是可读性极高、内容丰富的月刊. 我尤其欣赏 TIBS 中“教科书中的错误”(“Textbook Errors”)这一栏目.]

Fersht, A., 1985. *Enzyme Structure and Mechanism* (2nd ed.). W. H. Freeman. [包括多篇简洁明快的论文, 都是关于参与代谢的许多种酶的催化机理和调节机理的.]

Rose, I. A., 1981. Chemistry of proton abstraction by glycolytic enzymes (aldolase, isomerases, and pyruvate kinase). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 293 : 131—144.

Straus, D., Raines, R., Kawashima, E., Knowles, J. R., and Gilbert, W., 1985. Active site of triosephosphate isomerase: in vitro mutagenesis and characterization of an altered enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82 : 2272—2276.

Termonia, Y., and Ross, J., 1981. Oscillations and control features in glycolysis: analysis of resonance effects. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78 : 3563—3566.

Hers, H.-G., and Van Schaftingen, E., 1982. Fructose 2,6-bisphosphate two years after its discovery. *Biochem. J.* 206 : 1—12.

Van Schaftingen, E., and Hers, H.-G., 1986. Purification and properties of phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 159 : 359—365.

el-Maghrabi, M. R., Correia, J. J., Heil, P. J., Pate, T. M., Cobb, C. E., and Pilkis, S. J., 1986. Tissue distribution, immunoreactivity, and physical properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 261 : 8793—8798.

Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), 1983. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.). McGraw-Hill. [第5章和第7章讨论果糖和半乳糖代谢的疾病。第73章讨论红细胞中糖酵解酶类的缺乏。]

Muirhead, H., 1983. Triose phosphate isomerase, pyruvate kinase, and other  $\alpha/\beta$ -barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 8 : 326—330.

Marchionni, M., and Gilbert, W., 1986. The triosephosphate isomerase gene from maize : introns antedate the plant-animal divergence. *Cell* 46 : 133—141.

## 第 16 章

Baldwin, J. E., and Krebs, H., 1981. The evolution of metabolic cycles. *Nature* 291 : 381—382. [简明透辟, 重点是柠檬酸循环。]

Weitzman, P. D. J., 1981. Unity and diversity in some bacterial citric acid cycle enzymes. *Advan. Microbiol. Physiol.* 22 : 185—244.

Srere, P. A., 1987. Complexes of sequential metabolic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 89—124.

Wieland, O. H., 1983. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex; structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 96 : 123—170.

Beeckmans, S., 1984. Some structural and regulatory aspects of citrate synthase. *Eur. J. Biochem.* 16 : 341—351.

Singer, T. P., and Johnson, M. K., 1985. The prosthetic groups of succinate dehydrogenase; 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett.* 190 : 189—198.

Gottschalk, G., 1986. *Bacterial Metabolism* (2nd ed.). Springer-Verlag. [关于细菌代谢多样性以及其中多种多样生能过程的精采论文。]

Packman, L. C., Hale, G., and Perham, R. N., 1984. Repeating functional domains in the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 3 : 1315—1319.

Oliver, R. M., and Reed, L. J., 1982. Multienzyme complexes. In Harris, R., (ed.), *Electron Microscopy of Proteins*, vol. 2, pp. 1—48. Academic Press.

Hackert, M. L., Oliver, R. M., and Reed, L. J., 1983. A computer model analysis of the active-site coupling mechanism in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80 : 2907—2911.

Wiegand, G., and Remington, S. J., 1986. Citrate synthase; structure, control, and mechanism. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 97—117.

Chothia, C., and Lesk, A. M., 1985. Helix movements in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 116—118. [关于柠檬酸合酶中结构关闭分析, 有精美插图。]

Telser, J., Emptage, M. H., Merkle, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Hoffman, B. M., 1983.

<sup>17</sup>O electron nuclear double resonance characterization of substrate binding to the 4Fe-4S cluster of reduced active aconitase. *J. Biol. Chem.* 261 : 4840—4846.

Barnes, S. J., and Weitzman, P. D., 1986. Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. *FEBS Lett.* 201 : 267—270. [延胡索酸酶、苹果酸脱氢酶、柠檬酸合酶、乌头酸酶和异柠檬酸脱氢酶松散地结合于一多酶体系中。]

Robinson, J. B., Jr., Inman, L., Sumegi, B., and Srere, P. A., 1987. Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon. *J. Biol. Chem.* 262 : 1786—1790.

Reed, L. J., Damuni, Z., and Merryfield, M. L., 1985. Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr. Top. Cell Regul.* 27 : 41—

Williamson, J. R., and Cooper, R. H., 1980. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 117 (Suppl.) : K73—K85.

LaPorte, D. C., and Koshland, D. E., 1982. A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle. *Nature* 30 : 458—460.

Krebs, H. A., and Martin, A., 1981. *Reminiscences and Reflections*. Clarendon Press.

## 第 17 章

Nicholls, D. G., 1982. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*. Academic Press. [关于目前对于氧化磷酸化的了解的实验基础的简明著作.]

Harold, F. M., 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*. W. H. Freeman. [关于生物力能学的易懂而又严格的著作, 重点在于概念的发展. 第 7 章讨论线粒体和氧化磷酸化.]

Ernster, L., (ed.), 1984. *Bioenergetics*. Elsevier. [有多篇精采论文, 是关于线粒体和光合电子传递, ATP 合成, 代谢物转运系统和生热线粒体的.]

Tzagoloff, A., 1982. *Mitochondria*. Plenum. [有趣的插图、精美的著作, 讨论线粒体结构、生物发生、遗传、氧化磷酸化和 ATP 合成.]

Spiro, T. G., (ed.), 1982. *Iron-Sulfur Proteins*. Wiley-Inter science.

Hatefi, Y., 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 1015—1069.

Wikstrom, M., and Saraste, M., 1984. The mitochondrial respiratory chain. In L. Ernster, (ed.), *Bioenergetics*, pp. 49—94. Elsevier.

Casey, R. P., 1984. Membrane reconstitution of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 768 : 319—347,

Slater, E. C., 1983. The Q cycle, an ubiquitous mechanism of electron transfer. *Trends Biochem. Sci.* 8 : 239—242.

Margoliash, E., and Bosshard, H. R., 1983. Guided by electrostatics, a textbook protein comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 8 : 316—320.

Naqui, A., Chance, B., and Cadenas, E., 1986. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 137.

Wikstrom, M., Saraste, M., and Penttila, T., 1985. Relationships between structure and function in cytochrome oxidase. In A. N. Martonosi, (ed.), *The Enzymes of Biological Membranes*. vol. 4, pp. 111—148. Plenum.

McCarty, R. E., 1985.  $H^+$ -ATPases in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *BioScience* 35 : 27—30.

Kagawa, Y., 1984. Proton motive ATP synthesis. In L. Ernster, (ed.), *Bioenergetics*, pp. 149—186. Elsevier.

Walker, J. E., Saraste, M., and Gay, N. J., 1984. The *unc* operon: nucleotide sequence, regulation, and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 768 : 164—200.

Gressert, M. J., Myers, J. A., and Boyer, P. D., 1982. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial  $F_1$  adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257 : 12030—12038.

Cross, R. L., Cunningham, D., and Tamura, J. K., 1984. Binding change mechanism for ATP synthesis by oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Curr. Top. Cell. Regul.* 24 : 335—344.

Vignais, P. V., and Lunardi, J., 1985. Chemical probes of the mitochondrial ATP synthesis and translocation. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 977—1014.

Chance, B., Leigh, J. S., Jr., Kent, J., McCully, K., Nioka, S., Clark, B. J., Maris, J. M., and Graham, T., 1986. Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 9458—9462.

Klingenberg, M., 1985. Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocators from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 456 : 279—288.

Vignais, P. V., Block, M. R., Boulay, F., Brandolin, G., and Lauquin, G. J. -M., 1985. Molecular aspects of structure—function relationships in mitochondrial adenine nucleotide carrier. In G. Bengha, (ed.), *Structure and Properties of Cell Membranes*, vol. II, pp. 139—179. CRC Press.

Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. *Advan. Enzymol.* 58 : 61—97.

Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., and Richardson, D. C., 1983. Structure and mechanism of Cu, Zn superoxide dismutase. *Nature* 306 : 284—287.

## 第 18 章

Hers, H. -G., and Hue, L., 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 617—653.

Wood, T., 1985. *The Pentose Phosphate Pathway*. Academic Press.

Meister, A., and Anderson, M. E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 711—760.

Landau, B. R., and Wood, H. G., 1983. A critical examination of the evidence for the reactions of the pentose phosphate pathway in animal tissues. *Trends Biochem. Sci.* 8 : 292—296. [精细评论, 说明经典途径在所有哺乳动物组织中均起作用的证据.]

Melendez-Hevia, E., and Isidoro, A., 1985. The game of the pentose phosphate cycle. *J. Theor. Biol.* 117 : 251—263. [使五碳糖和六碳糖相互转变的最简单的途径是什么? 此文是用最优化选择的数学游戏来分析戊糖磷酸途径的. 阅读本文即可了解自然是否利用了最简单的可能方案.]

Thieme, R., Pai, E. F., Schirmer, R. H., and Schultz, G. E., 1981. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 152 : 763—782.

Meister, A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism *Science* 220 : 472—477.

Newsholme, E. A., Chaliss, R. A. J., and Crabtree, B., 1984. Substrate cycles: Their role in improving sensitivity in metabolic control. *Trends Biochem. Sci.* 9 : 277—280.

Beutler, E., 1983. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), pp. 1629—1653. McGraw-Hill.

## 第 19 章

Cohen, P., 1983. Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 302 : 13—25.

Fischer, E. H., 1983. Cellular regulation by protein phosphorylation. *Bull. Institut. Pasteur* 81 : 7—31.

Fletterick, R. J., 1983. Glycogen phosphorylase; plasticity and specificity in ligand binding. *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* 27 : 173—220.

Jenkins, J. A., Johnson, L. N., Stuart, D. I., Stura, E. A., Wilson, K. S., and Zanotti, G., 1981. Phosphorylase; control and activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 293 : 23—41.

Boyer, P. D., and Krebs, E. G., (eds.), 1986. *The Enzymes*, vol. 17. Academic Press. [此卷题为 *Control by Phosphorylation*, 内有数篇关于糖元代谢的精采论文. 还应参看第 18 卷关于通过可逆的磷酸化进行控制的严

密的综述.]

- Geddes, R., 1986. Glycogen: a metabolic viewpoint. *Biosci. Rep.* 6 : 415—428.
- Preiss, J., Yung, S. G., and Baeker, P. A., 1983. Regulation of bacterial glycogen synthesis. *Mol. Cell Biochem.* 57 : 61—80.
- Hers, H. -G., 1976. The control of glycogen metabolism in the liver. *Ann. Rev. Biochem.* 45 : 167—190.
- Lorek, A., Wilson, K. S., Sansom, M. S., Stuart, D. I., Stura, E. A., Jenkins, J. A., Zanotti, G., Hajdu, J., and Johnson, L. N., 1984. Allosteric interactions of glycogen phosphorylase b: A crystallographic study of glucose 6-phosphate and inorganic phosphate binding to di-imidate-crosslinked phosphorylase b. *Biochem. J.* 218 : 45—60.
- Sprang, S. R., Goldsmith, E. J., Fletterick, R. J., Withers, S. G., and Madsen, N. B., 1982. Catalytic site of glycogen phosphorylase; structure of the T state and specificity for alpha-D-glucose. *Biochemistry* 21 : 5364—5371.
- Withers, S. G., Madsen, N. B., Sprang, S. R., and Fletterick, R. J., 1982. Catalytic site of glycogen phosphorylase; structure changes during activation and mechanistic implications. *Biochemistry* 21 : 5372—5382.
- Hwang, P. K., and Fletterick, R. J., 1986. Convergent and divergent evolution of regulatory sites in eukaryotic phosphorylases. *Nature* 324 : 80—84.
- Klein, H. M., and Helmreich, E. J. M., 1985. The role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase catalysis. *Curr. Top. Cell. Regul.* 26 : 281—294.
- Klein, H. W., Im, W. J., and Palm, D., 1986. Mechanism of the phosphorylase reaction. Utilization of D-glucose-hept-1-enitol in the absence of primer. *Eur. J. Biochem.* 157 : 107—114.
- Withers, S. G., Madsen, N. B., and Sykes, B. D., 1981. Active form of pyridoxal phosphate in glycogen phosphorylase. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation. *Biochemistry* 20 : 1748—1756.
- Withers, S. G., Madsen, N. B., Sykes, B. D., Takagi, M., Shimomura, S., and Fukui, T., 1981. Evidence for direct phosphate-phosphate interaction between pyridoxal phosphate and substrate in the glycogen phosphorylase catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 256 : 10759—10762.
- Howell, R. R., and Williams, J. C., 1983. The glycogen storage diseases. In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), pp. 141—166. McGraw-Hill.
- Ross, B. D., Radda, G. K., Gadian, D. G., Rocker, G., Esiri, M., and Falconer-Smith, J., 1981. Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by <sup>31</sup>P NMR. *New Engl. J. Med.* 304 : 1338—1342.

## 第 20 章

- Wakil, S. J., Stoops, J. K., and Joshi, V. C., 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 537—579.
- Vance, D. E., and Vance, J. E., (eds.), 1985. *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Benjamin/Cummings. [有多篇精采论文. 第 3, 4, 5, 6 章是直接和脂肪酸代谢有关的.]
- Boyer, P. D., (ed.), 1983. *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 16 : *Lipid Enzymology*. Academic Press. [本卷内容丰富, 涉及脂类代谢的多方面的题材.]
- Numa, S., (ed.), 1984. *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation*. Elsevier. [此书简明, 可读性极高, 重点是细菌、植物和动物体内脂肪酸代谢的控制.]
- Foster, D. W., 1984. From glycogen to ketones—and back. *Diabetes* 33 : 1188—1199.
- Schulz, H., 1987. Inhibitors of fatty acid oxidation. *Life Sci.* 40 : 1443—1449.
- Borum, P. R., 1983. Carnitine. *Ann. Rev. Nutr.* 3 : 233—259.

- Bremer, J. , 1977. Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 2 : 207—209.
- Singh, N. , Wakil, S. J. , and Stoops, J. K. , 1985. Yeast fatty acid synthase; structure to function relationship. *Biochemistry* 24 : 6598—6602.
- Goodridge, A. G. , 1986. Regulation of the gene for fatty acid synthase. *Fed. Proc.* 45 : 2399—2405.
- Climent, I. , and Rubio, V. , 1986. ATPase activity of biotin carboxylase provides evidence for initial activation of  $\text{HCO}_3^-$  by ATP in the carboxylation of biotin. *Arch. Biochem. Biophys.* 251 : 465—470.
- Singh, N. , Wakil, S. J. , and Stoops, J. K. , 1985. The development and application of a novel chromophoric substrate for investigation of the mechanism of yeast fatty acid synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 : 786—792.

## 第 21 章

- Halpern, J. , 1985. Mechanisms of coenzyme  $\text{B}_{12}$ -dependent rearrangements. *Science* 227 : 869—875.
- Bender, D. A. , 1985. *Amino Acid Metabolism* (2nd ed. ). Wiley.
- Christen, P. , and Metzler, D. E. , 1985. *Transaminases*. Wiley.
- Meister, A. , 1965. *Biochemistry of the Amino Acids* (2nd ed. ), vols 1 and 2. Academic Press.
- Nozaki, M. , Yamamoto, S. , Ishimura, Y. , Coon, M. J. , Ernster, L. , and Estabrook, R. W. , (eds. ), 1982. *Oxygenases and Oxygen Metabolism. A Symposium in Honor of Osamu Hayaishi*. Academic Press.
- Barker, H. A. , 1981. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 23—40.
- Cooper, A. J. L. , 1983. Biochemistry of sulfur - containing amino acids. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 187—222.
- Nichol, C. A. , Smith, G. K. , and Duch, D. S. , 1985. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 729—764.
- Kirsch, J. F. , Eichele, G. , Ford, G. C. , Vincent, M. G. , Jansonius, J. N. , Gehring, H. , and Christen, P. , 1984. Mechanism of action of aspartate amino transferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* 174 : 497—525.
- Arnone, A. , Rogers, P. H. , Hyde, C. C. , Briley, P. D. , Metzler, C. M. , and Metzler, D. E. , 1985. Cytosolic pig heart aspartate aminotransferase; the structure of the internal aldimine, external aldimine, ketimine and of the beta subform. In Christen, P. , and Metzler, D. E. , (eds. ), *The Transaminases*, pp. 138—155. Wiley.
- Nyhan, W. L. , (ed. ), 1984. *Abnormalities in Amino Acid Metabolism in Clinical Medicine*. Appleton - Century - Crofts.
- Stanbury, J. B. , Wyngaarden, J. B. , Fredrickson, D. S. , Goldstein, J. L. , and Brown, M. S. , (eds. ), 1983. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed. ), McGraw - Hill. [第 3 部分标题为“Disorders of Amino Acid Metabolism”, 其中有许多关于此问题的好文章.]
- Wellner, D. , and Meister, A. , 1981. A survey of inborn errors of amino acid metabolism and transport in man. *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 911—968.
- Ledley, F. D. , Levy, H. L. , and Woo, S. L. C. , 1986. Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalanemia in families with both disorders. *New Engl. J. Med.* 314 : 1276—1280.
- Batshaw, M. L. , Brusilow, S. , Waber, L. , Blom, W. , Brubakk, A. M. , Burton, B. K. , Cann, H. M. , Kerr, D. , Mamunes, P. , Matalon, R. , Myerberg, D. , and Schafer, I. A. , 1982. Treatment of inborn errors of urea synthesis. *New Engl. J. Med.* 306 : 1387—1392.
- DiMagno, E. P. , Lowe, J. E. , Snodgrass, P. J. , and Jones, J. D. , 1986. Ornithine transcarbamylase deficiency; a cause of bizarre behavior in a man, *New Engl. J. Med.* 315 : 744—747.
- Wilcken, D. E. L. , Wilcken, B. , Dudman, N. P. B. , and Tyrrell, P. A. , 1983. Homocystinuria—the

effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *New Engl. J. Med.* 309 : 448—453.

## 第 22 章

Youvan, D. C., and Marrs, B. L., 1987. Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Amer.* 256 : 42—48.

Deisenhofer, J., Michel, H., and Huber, R., 1985. The structural basis of photosynthetic light reactions in bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 243—248.

Staehelin, L. A., and Arntzen, C. J., (eds.), 1986. *Photosynthesis III: Photosynthetic Membranes and Light Harvesting Systems*. Springer-Verlag. [关于光合作用的许多方面详尽文献的极好来源.]

Hoober, J. K., 1984. *Chloroplasts*. Plenum. [全面介绍叶绿体的结构、功能和遗传。有多幅内容丰富引人入胜的插图.]

Halliwell, B., 1984. *Chloroplast Metabolism* (revised ed.). Oxford University Press. [重点在二氧化碳固定、光呼吸和膜脂代谢.]

Steinback, K. E., Bonitz, S., Arntzen, C. J., Bogorad, L., (eds.), 1985. *Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harold, F. M., 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*. W. H. Freeman. [参看第8章“Harvesting the Light”，这是关于光合作用前景介绍.]

Anderson, J. M., 1986. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37 : 93—136.

Barber, J., 1985. Organization and dynamics of protein complexes within the chloroplast thylakoid membrane. *Biochem. Soc. Trans.* 14 : 1—4.

Miller, K. R., and Lyon, M. K., 1985. Do we really know why chloroplast membranes stack? *Trends Biochem. Sci.* 10 : 219—222.

Zuber, H., 1986. Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria, and red algae. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 414—419.

Glazer, A. N., 1985. Light harvesting by phycobilisomes. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 : 47—77.

Tronrud, D. E., Schmid, M. F., and Matthews, B. W., 1986. Structure and X-ray amino acid sequence of a bacteriochlorophyll a protein from *Prosthecochloris aestuarii* refined at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 188 : 443—454.

Glazer, A. N., and Melis, A., 1987. Photochemical reaction centers: structure, organization, and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38 : 11—45.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H., 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318 : 618—624.

Prince, R. C., 1986. Manganese at the active site of the chloroplast oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 491—492.

Brudvig, G. W., and Crabtree, R. H., 1986. Mechanism for photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 4586—4588.

Blankenship, R. E., and Prince, R. C., 1985. Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 382—383. [关于激发态的氧化还原特性的简明扼要的叙述.]

Melandri, B. A., and Venturoli, G., 1984. Photosynthetic electron transfer. In Ernster, L., (ed.), *Bioenergetics*, pp. 95—148. Elsevier.

Cramer, W. A., Widger, W. R., Herrmann, R. G., and Trebst, A., 1985. Topography and function of thylakoid membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 125—129.



McCarty, R. E., and Moroney, J. V., 1985. Functions of the subunits and regulation of chloroplast coupling factor 1. In Martonosi, A., (ed.), *The Enzymes of Biological Membranes* (2nd ed.), vol. 4, pp. 383—413. Plenum.

Strotmann, H., and Bickel-Sandkötter, S., 1984. Structure, function, and regulation of chloroplast ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 97—120.

Ellis, R. J., and Gray, J. C., (eds.), 1986. Ribulose biphosphate carboxylase—oxygenase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B313 : 303—469. [关于此酶的催化机理、三维结构、进化和分子遗传学方面的精采论文.]

Miziorko, H. M., and Lorimer, G. H., 1982. Ribulose—1, 5—biphosphate carboxylase—oxygenase. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 507—535.

Schneider, G., Lindqvist, Y., Brädén, C-I., and Lorimer, G., 1986. Three—dimensional structure of ribulose—1, 5—biphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2.9 Å resolution. *EMBO J.* 5 : 3409—3415.

Burnell, J. N., and Hatch, M. D., 1985. Light—dark modulation of leaf pyruvate, P<sub>i</sub> dikinase. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 288—291.

Ogren, W. L., 1984. Photorespiration; pathways, regulation, and modification. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 415—442.

Arnon, D. I., 1987. Photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation by chloroplasts: assertion, refutation, discovery. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 39—42.

Arnon, D. I., 1984. The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 9 : 258—262.

## 第 23 章

Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1986. A receptor—mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 : 34—47.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Amer.* 251 (5) : 58—66.

Vance, D. E., and Vance, J. E., (eds.), 1985. *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Benjamin/Cummings. [关于脂类的代谢、遗传和组装的论文集萃.]

Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), 1983. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.). McGraw—Hill. [有关于神经脂类、脂蛋白、胆固醇和固醇代谢的遗传疾病的精采论文.]

Hawthorne, J. N., and Ansell, G. B., (eds.), 1982. *Phospholipids*. Elsevier.

Hakomori, S., 1986. Glycosphingolipids. *Sci. Amer.* 254 (5) : 44—53. [在细胞分化和癌细胞形成中这些脂类变化的精采论述.]

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowitz, J. B., 1986. Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 69.

Majerus, P., Connolly, T. M., Deckmyn, H., Ross, T. S., Bross, T. E., Ishii, H., Bansal, V. S., and Wilson, D. B., 1986. The metabolism of phosphoinositide—derived messenger molecules. *Science* 234 : 1519—1526.

Raetz, C. R. H., 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Ann. Rev. Genet.* 20 : 253—295.

Dennis, E. A., 1983. Phospholipases. In P. D. Boyer (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 16 pp. 307—353. Academic Press.

Hanahan, D. J., 1986. Platelet—activating factor; a biologically active phosphoglyceride. *Ann. Rev. Biochem.* 55 :

483—509.

Bloch, K., 1983. Sterol structure and membrane function. *Crit. Rev. Biochem.* 14 : 47—92.

Schroepfer, G. J., Jr., 1982. Sterol biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 555—585.

DeLuca, H. F., and Schnoes, H. K., 1983. Vitamin D: recent advances. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 411—439.

Nebert, D. W., and Gonzales, F. J., 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 945—993.

Atkinson, D., and Small, D. M., 1986. Recombinant lipoproteins: implications for structure and assembly of native lipoproteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 403.

Breslow, J. L., 1985. Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 699—727.

Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W., 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228 : 815—822.

Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russell, D. W., and Schneider, W. J., 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 1—39.

Yang, C. -Y., Chen, S. -H., Gianturco, S. H., Bradley, W. A., Sparrow, J. T., Tanimura, M., Li, W. -H., Sparrow, D. A., DeLoof, H., Rosseneu, M., Lee, F. -S., Gu, Z. -W., Gotto, A. M., Jr., and Chan, L., 1986. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* 323 : 738—742.

Goldstein, J. L., Kita, T., and Brown, M. S., 1983. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *New Engl. J. Med.* 309 : 288—296.

Knott, T. J., Pease, R. J., Powell, L. M., Wallis, S. C., Rall, S. C., Jr., Innerarity, T. L., Blackhart, B., Taylor, W. H., Marcel, Y., Milne, R., Johnson, D., Fuller, M., Lusis, A. J., McCarthy, B. J., Mahley, R. W., Levy-Wilson, B., and Scott, J., 1986. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 323 : 734—738.

Ma, P. T., Gil, G., Sudhof, T. C., Bilheimer, D. W., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., 1986. Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 8370—8374.

Ross, R., 1986. The pathogenesis of atherosclerosis — an update. *New Engl. J. Med.* 314 : 488—500.

## 第 24 章

Bender, D. A., 1985. *Amino Acid Metabolism* (2nd ed.). Wiley. Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), 1983. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), McGraw-Hill. [有许多篇精采论文,是关于氨基酸、卟啉和血红素代谢的紊乱的.]

Evans, H. J., Bottomley, P. J., and Newton, W. E., (eds.), 1985. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Martinus Nijhoff. Blakley, R. L., and Benkovic, S. J., 1985. *Folates and Pterins*, vol. 2. Wiley. [这一丛书中的本卷讨论叶酸类和蝶呤素类的化学和生物化学。有数篇关于苯丙氨酸羟化酶的优秀论文。]

Orme-Johnson, W. H., 1985. Molecular basis of biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 : 419—459.

Shah, V. K., Ugalde, R. A., Imperial, J., and Brill, W. J., 1984. Molybdenum in nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 231—257.

Emerich, D. W., Hageman, R. V., and Burris, R. H., 1981. Interactions of dinitrogenase and dinitrogenase reductase. *Advan. Enzymol.* 52 : 1—22.

Cooper, A. J. L., 1983. Biochemistry of sulfur - containing amino acids. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 187—222.

Almasy, R. J., Janson, C. A., Hamlin, R., Xuong, N. -H., and Eisenberg, D., 1986. Novel subunit - subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* 323 : 304—309.

Meister, A., and Anderson, M. E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 711—760.

Meister, A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220 : 472—477.

Epp, O., Ladenstein, R., and Wendel, A., 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* 133 : 51—69.

Shemin, D., 1982. From glycine to heme. In Kaplan, N. O., and Robinson, A. (eds.), *From Cyclotrons to Cytochromes*, pp. 117—129. Academic Press. [关于早期应用同位素揭示这一生物合成途径的分析性和回顾性论文.]

Porra, R. J., and Meisch, H. -U., 1984. The biosynthesis of chlorophyll. *Trends Biochem. Sci.* 9 : 99—104.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., and Ames, B. N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiologic importance. *Science* 235 : 1043—1046.

Stocker, R., Glazer, A. N., and Ames, B. N., 1987. Antioxidant activity of albumin - bound bilirubin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84 : 5918—5922.

## 第 25 章

Reichard, P., and Ehrenberg, A., 1983. Ribonucleotide reductase—a radical enzyme. *Science* 221 : 514—519.

Villafranca, J. E., Howell, E. E., Voet, D. H., Strobel, M. S., Ogden, R. C., Abelson, J. N., and Kraut, J., 1983. Directed mutagenesis of dihydrofolate reductase. *Science* 222 : 782—788.

Hardy, L. W., Finer - Moore, J. S., Montfort, W. R., Jones, M. O., Santi, D. V., and Stroud, R. M., 1987. Atomic structure of thymidylate synthase, target for rational drug design. *Science* 235 : 448—455.

Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant - and radical - caused aging and cancer; a hypothesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78 : 6858—6862.

Much - Petersen, A., (ed.), 1983. *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides, and Nucleobases in Microorganisms*. Academic Press.

Reese, C. B., (ed.), 1984. *Recent Aspects of the Chemistry of Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*. Pergamon.

Blakley, R. L., and Benkovic, S. J., 1985. *Folates and Pterins*, vols. 1 and 2. Wiley.

Daubner, S. C., Schrishsher, J. L., Schendel, F. J., Young, M., Henikoff, S., Patterson, D., Stubbe, J., and Benkovic, S. J., 1985. A multifunctional protein possessing glycinamide ribonucleotide synthetase, glycinamide ribonucleotide transformylase, and aminoimidazole ribonucleotide synthetase activities in de novo purine biosynthesis. *Biochemistry* 24 : 7059—7062.

Lee, L., Kelly, R. E., Pastra - Landis, S. C., and Evans, D. R., 1985. Oligomeric structure of the multifunctional protein CAD that initiates pyrimidine biosynthesis in mammalian cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 6802—6806.

Floyd, E. E., and Jones, M. E., 1985. Isolation and characterization of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase domain of the multifunctional protein uridine 5'-monophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 260 : 9443—9451.

Barlow, T., Eliasson, R., Platz, A., Reichard, P., and Sjöberg, B. -M., 1983. Enzymic modification of a tyrosine residue to a stable free radical in ribonucleotide reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80 : 1492—1495.

Eliasson, R., Jornvall, H., and Reichard, P., 1986. Superoxide dismutase participates in the enzymatic formation of the tyrosine radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 2373—2377.

Stubbe, J. A., 1983. Mechanism of  $B_{12}$ -dependent ribonucleotide reductase. *Mol. Cell Biochem.* 50 : 25—45.

Ashley, G. W., Harris, G., Stubbe, J., 1986. The mechanism of *Lactobacillus leichmannii* ribonucleotide reductase. Evidence for  $3'C-H$  bond cleavage and a unique role for coenzyme  $B_{12}$ . *J. Biol. Chem.* 261 : 3958—3964.

Holmgren, A., 1985. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 237—271.

Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B. M., Holmgren, A., Jornvall, H., Hoog, J. O., and Brändén, C. I., 1981. Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* 3 : 1443—1449.

Howell, E. E., Villafranca, J. E., Warren, M. S., Oatley, S. J., and Kraut, J., 1986. Functional role of aspartic acid-27 in dihydrofolate reductase revealed by mutagenesis. *Science* 231 : 1123—1128.

Roth, B., 1986. Design of dihydrofolate reductase inhibitors from x-ray crystal structures. *Fed. Proc.* 45 : 2765—2772.

Schimke, R. T., 1986. Methotrexate resistance and gene amplification. Mechanisms and implications. *Cancer* 57 : 1912—1917.

Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), 1983. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.). McGraw-Hill. [关于嘌呤和嘧啶的先天性错误的几章很精采。参看 J. B. Wyngaarden 和 W. B. Kelley 所著关于痛风和 Lesch-Nyhan 综合症一文；W. N. Kelly 和 L. H. Smith, Jr. 所著关于乳清酸尿一文和 J. B. Wyngaarden 所著关于黄素尿 (xanthinuria) 一文。]

Gruber, H. E., Finley, K. D., Hershberg, R. M., Katzman, S. S., Laikind, P. K., Seegmiller, J. E., Friedmann, T., Yee, J. K., and Jolly, D. J., 1985. Retroviral vector-mediated gene transfer into human progenitor cells. *Science* 230 : 1057—1061. [将人的 HGPRT 基因转移到人的骨髓细胞中。]

Wilson, J. M., Young, A. B., and Kelley, W. N., 1983. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *New Engl. J. Med.* 309 : 900—910.

Seegmiller, J. E., 1985. Overview of possible relation of defects in purine metabolism to immune deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 451 : 9—19.

## 第 26 章

Foster, D. W., 1984. From glycogen to ketones—and back. *Diabetes* 33 : 1188—1199. [关于合成代谢和分解代谢如何被胰岛素-胰高血糖素之比所灵敏地控制的一篇晓畅的论文。]

Randle, P. J., 1986. Fuel selection in animals. *Biochem. Soc. Trans.* 14 : 799—806. [有关丙酮酸脱氢酶复合物的控制及其在燃料选择方面重要性的优秀论文。]

Hers, H.-G., Hue, L., and Van Schaftingen, E., 1983. Fructose 2, 6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.* 7 : 329—333.

Cerami, A., Vlassara, H., and Brownlee, M., 1987. Glucose and aging. *Sci. Amer.* 256 (3) : 90—96. [关于由葡萄糖再活化引起的破坏性后果的有趣论文。]

Ochs, R. S., Hanson, R. W., and Hall, J., (eds.), 1985. *Metabolic Regulation*. Elsevier. [关于原核生物以及高等生物代谢控制的许多有趣论文的集子。]

Newsholme, E., and Leech, T., 1983. *The Runner: Energy and Endurance*. Fitness Books. [关于跑步过程中能量利用的生化和生理基础的引人入胜的著作。]

McGarry, J. D., Kuwajima, M., Newgard, C. B., and Foster, D. W., 1987. From dietary glucose to liver glycogen—the full circle round. *Ann. Rev. Nutrition* 7 : 51—73.

- Nordlie, R. C., 1984. Fine tuning of blood glucose concentrations. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 70—75.
- El-Maghrabi, M. R., Correia, J. J., Heil, P. J., Pate, T. M., Cobb, C. E., and Pilgis, S. J., 1986. Tissue distribution, immunoreactivity, and physical properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 5005—5009. [在肝脏和肌肉中果糖 2,6-二磷酸的控制方式不同.]
- Kitakura, K., and Uyeda, K., 1987. The mechanism of activation of heart fructose 6-phosphate, 2-kinase; fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 262 : 679—681. [实验报告, 证明心脏中此酶为磷酸化所活化, 与肝脏中的不同.]
- Hers, H. -G., and Hue, L., 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 617—653.
- Foster, D. W., and McGarry, J. D., 1983. The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *New Engl. J. Med.* 309 : 159—169.
- Foster, D. W., 1983. Diabetes mellitus. In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), pp. 99—117. McGraw-Hill.
- Cohen, M. P., 1986. *Diabetes and Protein Glycosylation*. Springer-Verlag.

## 第 27 章

- Dickerson, R. E., 1983. The DNA helix and how it is read. *Sci. Amer.* 249 (6) 94—111.
- Wang, J. C., 1982. DNA topoisomerases. *Sci. Amer.* 247 (1) : 94—109.
- Kornberg, A., 1984. DNA replication. *Trends Biochem. Sci.* 9 : 122—124.
- Howard-Flanders, P., 1981. Inducible repair of DNA. *Sic. Amer.* 245 (5) : 72—80.
- Ames B., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221 : 1256—1264.
- Kornberg, A., 1980. *DNA Replication*. W. H. Freeman. [杰作, 内容丰富、见解透彻. 1982 年的 *Supplement to DNA Replication* 是有价值的新资料的补充.]
- Saenger, W., 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag. [渊博的、插图精美的基本原理的介绍. 关于核苷酸和核酸的立体化学有明晰易懂的介绍.]
- Friedberg, E. C., 1985. *DNA Repair*. W. H. Freeman. [原核生物及真核生物中 DNA 修复机理的介绍, 明晰又有图解.]
- Jurnak, F. A., and McPherson, A., (eds.), 1985. *Biological Macromolecules and Assemblies*, vol. 2. [有关于 DNA 结构和 DNA-蛋白质复合物的精采论文.]
- Kelly, T., and McMacken, R., (eds.), 1986. *Mechanisms of DNA Replication and Recombination*. Alan R. Liss.
- Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1982. *Structures of DNA*, vol. 47. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kirkwood, T. B. L., Rosenberger, R. F., and Galas, D. J., (eds.), 1986. *Accuracy in Molecular Processes*. Chapman and Hall. [关于遗传信息的复制和表达的精确性的有趣的讨论. 第 8—9 章讨论 DNA 复制的精确性.]
- Dickerson, R. E., Drew, H. R., Conner, B. N., Wing, R. M., Fratini, A. V., and Kopka, M. L., 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216 : 475—485.
- Rich, A., Nordheim, A., and Wang, A. H. -J., 1984. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 791—846.
- Koo, H. -S., Wu, H. -M., and Grothers, D. M., 1986. DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature* 320 : 501—506.

- Sherman, S. E. , Gibson, D. , Wang, A. H. -J. , and Lippard, S. J. , 1985. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA; *cis* - [Pt (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> {d (pGpG)}]. *Science* 230 : 412—417.
- Saenger, W. , Hunter, W. N. , and Kennard, O. , 1986. DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups. *Nature* 324 : 385—388.
- Levene, S. D. , and Grothers, D. M. , 1986. Topological distributions and the torsional rigidity of DNA. A Monte Carlo study of DNA circles. *J. Mol. Biol.* 189 : 73—83.
- Peck, L. J. , Wang, J. G. , Nordheim, A. , and Rich, A. , 1986. Rate of B to Z structural transition of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 190 : 125—127.
- Suck, D. , and Oefner, G. , 1986. Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DAN. *Nature* 321 : 620—625.
- McClarín, J. A. , Frederick, C. A. , Wang, B. -C. , Greene, P. , Boyer, H. W. , Grable, J. , and Rosenberg, J. M. , 1986. Structure of the DNA-EcoRI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* 234 : 1526—1541.
- Willis, A. E. , and Lindahl, T. , 1987. DNA ligase I deficiency in Bloom's syndrome. *Nature* 325 : 355—357.
- Wang, J. C. , 1987. Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochem. Biophys. Acta* 909 : 1—9.
- Maxwell, A. , and Gellert, M. , 1986. Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. *Advan. Protein Chem.* 38 : 69—107.
- Wasserman, S. A. , and Cozzarelli, N. R. , 1986. Biochemical topology : applications to DNA recombination and replication. *Science* 232 : 951—960.
- Wang, J. C. , 1985. DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 665—697.
- Dean, F. B. , and Cozzarelli, N. R. , 1985. Mechanism of strand passage by *Escherichia coli* topoisomerase I. The role of the required nick in catenation and knotting of duplex DNA. *J. Biol. Chem.* 260 : 4984—4994.
- Kirchhausen, T. , Wang, J. C. , and Harrison, S. C. , 1985. DNA gyrase and its complexes with DNA; direct observation by electron microscopy. *Cell* 41 : 933—943.
- Gellert, M. , 1981. DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 879—910.
- Menzel, R. , and Gellert, M. , 1983. Regulation of the genes for *E. coli*. DNA gyrase; homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* 34 : 105—113.
- Steitz, T. A. , Freemont, P. S. , Ollis, D. L. , Joyce, C. M. , and Grindley, J. M. , 1986. Functional implications of the Klenow fragment structure. *Biochem. Soc. Trans.* 14 : 205—207.
- Ollis, D. L. , Brick, P. , Hamlin, R. , Xuong, N. G. , and Steitz, T. A. , 1985. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 315 : 762—766.
- Warwicker, J. , Ollis, D. , Richards, F. M. , and Steitz, T. A. , 1985. Electrostatic field of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 186 : 645—649.
- McHenry, C. S. , 1985. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*; components and function of a true replicative complex. *Mol. Cell Biochem.* 66 : 71—85.
- LaDuca, R. J. , Crute, J. J. , McHenry, C. S. , and Bambara, R. A. , 1986. The beta subunit of the *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme interacts functionally with the catalytic core in the absence of other subunits. *J. Biol. Chem.* 261 : 7550—7557.
- Joyce, C. M. , and Steitz, T. A. , 1987. DNA polymerase I : from crystal structure to function via genetics. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 288—292.
- Baker, T. A. , Funnell, B. E. , and Kornberg, A. , 1987. Helicase action of dnaB protein during replication from the *Escherichia coli* chromosomal origin in vitro. *J. Biol. Chem.* 262 : 6877—6855.

- Echols, H., 1986. Multiple DNA-protein interactions governing high-precision DNA transactions. *Science* 233 : 1050—1056.
- Kwon-Shin, O., Bodner, J. B., McHenry, C. S., and Bambara, R. A., 1987. Properties of initiation complexes formed between *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme and primed DNA in the absence of ATP. *J. Biol. Chem.* 262 : 2121—2130.
- Zyskind, J. W., and Smith, D. W., 1986. The bacterial origin of replication, *oriC*. *Cell* 46 : 489—490.
- Kornberg, A., 1983. Mechanism of replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Eur. J. Biochem.* 137 : 377—382.
- Chase, J. W., and Williams, K. R., 1986. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 103.
- Alberts, B. M., 1984. The DNA enzymology of protein machines. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 49 : 1—12. [重点是T4噬菌体所用的复制机器.]
- Walker, G. C., 1985. Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev. Biochem.* 4 : 425—457.
- Sancar, G. B., and Sancar, A., 1987. Structure and function of DNA photolyases. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 259—261.
- Modrich, P., 1987. DNA mismatch correction. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 435—466.
- Lindahl, T., 1982. DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 61—87.
- Sancar, G. B., and Rupp, W. D., 1983. A novel repair enzyme: uvrABC excision nuclease of *E. coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* 33 : 249—260.
- Yeung, A. T., Mattes, W. B., Oh, E. Y., and Grossman, L., 1983. Enzymatic properties of purified *Escherichia coli* uvrABC proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80 : 6157—6161.
- Hunter, W. N., Brown, T., Anand, N. N., and Kennard, O., 1986. Structure of an adenine-cytosine base pair in DNA and its implications for mismatch repair. *Nature* 320 : 552—555.
- Sinha, N. K., 1987. Specificity and efficiency of editing of mismatches involved in the formation of base-substitution mutations by the 3'→5' exonuclease activity of phage T4 DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84 : 915—919.
- Cleaver, J. E., and Karentz, D., 1986. DNA repair in man; regulation by a multigene family and association with human disease. *Bioessays* 6 : 122—127.
- Cleaver, J. E., 1983. Xeroderma pigmentosum. In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), pp. 1227—1248. McGraw-Hill.
- Singer, B., and Kusmierek, J. T., 1982. Chemical mutagenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 655—693.
- Echols, H., Lu, C., and Burgers, P. M. J., 1983. Mutator strains of *Escherichia coli*, *mutD* and *dnaQ*, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80 : 2189—2192.

## 第 28 章

- Stahl, F. W., 1987. Genetic recombination. *Sci. Amer.* 256 (2) : 90—101.
- Dressler, D., and Potter, H., 1982. Molecular mechanisms in genetic recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 727—761. [本综述中清晰地介绍了 Holliday 模型.]
- Cox, M. M., and Lehman, I. R., 1987. Enzymes of general recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 229—262. [对 *recA* 和 *recB* 蛋白质的作用作了透彻的介绍.]
- Cold Spring Harbor Laboratory, 1984. *Recombination at the DNA Level*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* Volume 49. [关于重组的各个方面的丰富资料来源.]
- Scaife, J., Leach, D., and Galizzi, A., (eds.), 1985. *Genetics of Bacteria*. Academic Press. [阅读 7、9、

11、12 和 13 章, 有关于重复和易位方面的精采论文.]

Shapiro, J. A., (ed.), 1983. *Mobile Genetic Elements*. Academic Press.

Stahl, F. W., 1979. *Genetic Recombination*. W. H. Freeman.

Suzuki, D. T., Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., and Lewontin, R. C., 1986. *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman. [第 16 和 17 章是从遗传学观点对重组和易位的简明介绍.]

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., and Painter, P. R., 1986. *The Microbial World* (5th ed.). Prentice-Hall. [第 11 章讨论微生物中的基因交换和重组.]

Kowalczykowski, S. C., 1987. Mechanistic aspects of the DNA strand exchange activity of *E. coli* recA protein. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 141—145.

Howard-Flanders, P., West, S. C., and Stasiak, A., 1984. Role of recA protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature* 309 : 215—220.

Bryant, F. R., Taylor, A. R., and Lehman, I. R., 1985. Interaction of the recA protein of *E. coli* with single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 260 : 1196—1202.

Honigberg, S. M., Rao, B. J., and Radding, C. M., 1986. Ability of recA protein to promote a search for rare sequences in duplex DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 9586—9590.

Cox, M. M., and Lehman, I. R., 1981. recA protein of *E. coli* promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78 : 3433—3437.

Egelman, E. H., and Stasiak, A., 1986. Structure of helical recA-DNA complexes. Complexes formed in the presence of ATP- $\gamma$ -S or ATP. *J. Mol. Biol.* 191 : 677—697.

Howard-Flanders, P., 1981. Inducible repair of DNA. *Sci. Amer.* 245 (5) : 72—80.

Walker, G. C., 1985. Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 425—457.

Friedberg, E. C., 1985. *DNA Repair*. W. H. Freeman. [第 7 章讨论 SOS 修复.]

Grindley, N. D. F., and Reed, R. R., 1985. Transpositional recombination in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 863—896.

Derbyshire, K. M., and Grindley, N. D. F., 1986. Replicative and conservative transposition in bacteria. *Cell* 47 : 325—327.

Wasserman, S. A., and Cozzarelli, N. R., 1986. Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. *Science* 232 : 951—960. [关于定位重组中的拓扑学因素的引人入胜的讨论. 分析了 DNA 的环连体和结构, 以揭示例如分解酶这样的拓扑异构酶的机理.]

Boocock, M. R., Brown, J. L., and Sherratt, D. J., 1986. Structural and catalytic properties of specific complexes between Tn3 resolvase and the recombination site *res*. *Biochem. Soc. Trans.* 14 : 214—216.

Clewell, D. B., and Gawron-Burke, C., 1986. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Ann. Rev. Microbiol.* 40 : 635—659.

## 第 29 章

Darnell, J. E., Jr., 1985. RNA. *Sci. Amer.* 253 (4) : 68—78.

Darnell, J. E., Jr., 1983. The processing of RNA. *Sci. Amer.* 249 (4) : 90—100.

Sharp, P. A., 1987. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235 : 766—771.

Aebi, M., and Weissmann, C., 1987. Precision and orderliness in splicing. *Trends Genet.* 3 : 102—107.

Cech, T. R., 1986. RNA as an enzyme. *Sci. Amer.* 255 (5) : 64—75.

Lewin, B., 1987. *Genes* (3rd ed.). Wiley. [第 9、11、23 和 24 章是关于 RNA 合成和加工的精采论述.]

Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., Weiner, A. M., 1987. *Molecular Biology*



of the Gene (4th ed.). Benjamin/Cummings. [第 13、18 和 21 章讨论转录及其控制, 列举了大量实验数据.]

Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D., 1986. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. [第 8—9 章讨论 RNA 的合成和加工. 第 25 章为关于剪接的进化方面的极有趣的讨论.]

Chamberlin, M., 1982. Bacterial DNA-dependent RNA polymerases. In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes*, vol. 15, pp. 61—108. Academic Press.

Lewis, M. K., and Burgess, R. R., 1982. Eukaryotic RNA polymerases. In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes*, vol. 15, pp. 109—153. Academic Press.

von Hippel, P. H., Bear, D. G., Morgan, W. D., and McSwiggen, J. A., 1984. Protein—nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 389—446.

McClure, W. R., 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 171—204.

Park, C. S., Wu, F. Y. -H., and Wu, C. -W., 1982. Molecular mechanism of promoter selection in gene transcription. *J. Biol. Chem.* 257 : 6950—6956.

Johnson, W., Moran, C., Losick, R., 1983. Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. *Nature* 302 : 800—804.

Grossman, A., Erickson, J., and Gross, C., 1984. The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 37 : 383—390.

Dynan, W. S., and Tjian, R., 1985. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316 : 774—778.

Khoury, G., and Gruss, P., 1983. Enhancer elements. *Cell* 33 : 313—315.

Platt, T., 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 339—372.

Brennan, C. A., Dombroski, A. J., and Platt, T., 1987. Transcription termination factor rho is an RNA-DNA helicase. *Cell* 48 : 945—952.

Yager, T. D., and von Hippel, P. H., 1987. Transcript elongation and termination. In Neidhardt, F. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium; Cellular and Molecular Biology* (in preparation), American Society of Microbiology.

Birnstiel, M. L., Busslinger, M., and Strub, K., 1985. Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* 41 : 349—359.

Sharp, P. A., 1985. On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42 : 397—400.

Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S., and Sharp, P. A., 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 1119.

Brody, E., and Abelson, J., 1985. The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228 : 963—967.

Steitz, J. A., 1987. The mammalian premessenger RNA splicing apparatus: a ribosome in pieces? In Inoue, M., and Dudock, B. S., (eds.), *Molecular Biology of RNA; New Perspectives* (in preparation).

Chabot, B., Black, D. L., LeMaster, D. M., and Steitz, J. A., 1985. The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science* 230 : 1344—1349.

Berget, S. M., and Roberson, B. L., 1986. U1, U2, and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for in vitro splicing but not polyadenylation. *Cell* 46 : 691—696.

Black, D. L., Chabot, B., and Steitz, J. A., 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 42 : 737—750.

Grabowski, P. J., and Sharp, P. A., 1986. Affinity chromatography of splicing complexes; U2, U5, and

U4+U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome. *Science* 233 : 1294—1299.

Krainer, A. R. , and Maniatis, T. , 1985. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42 : 725—736.

Padgett, R. A. , Konarska, M. M. , Grabowski, P. J. , Hardy, S. F. , and Sharp, P. A. , 1984. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225 : 898—903.

Reed, R. , and Maniatis, T. , 1986. A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection. *Cell* 46 : 681—690.

Ruskin, B. , and Green, M. R. , 1985. An RNA processing activity that debranches RNA lariats. *Science* 229 : 135—140.

Wolin, S. L. , 1985. Small cytoplasmic ribonucleoproteins. *Trends Genet.* 1 : 201—204.

Cech, T. R. , 1987. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* 236 : 1532—1539.

Cech, T. R. , and Bass, B. L. , 1986. Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 599.

Zaug, A. J. , Been, M. D. , and Cech, T. R. , 1986. The *Tetrahymena* ribozyme acts like an RNA restriction endonuclease. *Nature* 324 : 429—433.

Garriga, G. , Lambowitz, A. M. , Inoue, T. , and Cech, T. R. , 1986. Mechanism of recognition of the 5' splice site in self-splicing group I introns. *Science* 222 : 86—89.

Szostak, J. W. , 1986. Enzymatic activity of the conserved core of a group I self-splicing intron. *Nature* 322 : 83—86.

Waring, R. B. , Towner, P. , Minter, S. J. , and Davies, R. W. , 1986. Splice-site selection by a self-splicing RNA of *Tetrahymena*. *Nature* 321 : 133—139.

## 第 30 章

Lake, J. A. , 1981. The ribosome. *Sci. Amer.* 245 (2) : 84—97.

Nomura, M. , 1984. The control of ribosome synthesis. *Sci. Amer.* 250 (1) : 102—114.

Spirin, A. S. , 1986. *Ribosome Structure and Protein Synthesis*. Benjamin/Cummings.

Clark, B. F. C. , and Petersen, H. F. , (eds. ), 1984. *Gene Expression. The Translational Step and Its Control*. Munksgaard, Copenhagen.

Bermek, E. , (ed. ), 1985. *Mechanisms of Protein Synthesis. Structure—Function Relations, Control Mechanisms, and Evolutionary Aspects*. Springer—Verlag.

Weissbach, H. , and Pestka, S. , (eds. ), 1977. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*. Academic Press.

Chambliss, G. , Craven, G. R. , Davies, J. , Davis, K. , Kahan, L. , and Nomura, M. , (eds. ), 1980. *Ribosomes; Structure, Function, and Genetics*. University Park Press.

Cold Spring Harbor Laboratory, 1969. *Mechanisms of Protein Biosynthesis*. (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, vol. 34).

Schimmel, P. , 1987. Aminoacyl tRNA synthetases; general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 125—158.

Blow, D. M. and Brick, P. 1985. Aminoacyl—tRNA synthetases. In Jurnak, F. A. , and McPherson, A. , (eds. ), *Biological Macromolecules and Assemblies*, vol. 2; *Nucleic Acids and Interactive Proteins*, pp. 441—469. Wiley—Interscience. [介绍 X 射线结晶学的分析.]

Fersht, A. R. , Leatherbarrow, R. J. , and Wells, T. N. C. , 1986. Structure and reactivity of the tyrosyl—tRNA synthetase; the hydrogen bond in catalysis and specificity. *Phil. Trans. R. Soc. London A317* : 305—320.

Bedouelle, H. , and Winter, G. , 1986. A model of synthetase/transfer RNA interaction as deduced by protein

engineering. *Nature* 320 : 371—373.

Leatherbarrow, R. J., Fersht, A. R., and Winter, G., 1985. Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 7840—7844.

Noller, H. F., 1984. Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 119—162.

Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R., and Noller, H. F., 1985. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32 : 154—216.

Thompson, J. F., and Hearst, J. E., 1983. Structure-function relations in *E. coli* 16S RNA. *Cell* 33 : 19—24.

Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G., 1984. Regulation of the synthesis of ribosomal components. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 75—117.

Wittmann, H. G., 1983. Architecture of procaryotic ribosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 35—65.

Maltra, U., Stringer, E. A., and Chaudhuri, A., 1982. Initiation factors in protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 869—900.

Jurnak, F., 1985. Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to *ras* oncogene proteins. *Science* 230 : 32—36.

Björk, G. R., Ericson, J. U., Gustafsson, C. E. D., Hagervall, T. G., Jonsson, Y. H., and Wikström, P. M., 1987. Transfer RNA modification. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 263—288.

Nakajima, N., Ozeki, H., and Shimura, Y., 1981. Organization and structure of an *E. coli* tRNA operon containing seven tRNA genes. *Cell* 23 : 239—249.

Guerrier-Takada, C., and Altman, S., 1984. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* 223 : 285—286. [示证使 tRNA 前体分解的酶, 即 RNA 酶 P 的 RNA 部分在没有蛋白质的情况下仍有催化活力.]

Temple, G. F., Dozy, A. M., Roy, K. L., and Kan, Y. W., 1982. Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature* 296 : 537—540.

Kirkwood, T. B. L., Rosenberger, R. F., and Galas, D. J., (eds.), 1986. *Accuracy in Molecular Processes. Its Control and Relevance to Living Systems*. Chapman and Hall. [一本引人入胜的书. 第 4—6 章讨论蛋白质合成的精确性, 第 11 章讨论校对的动力学代价.]

Fersht, A., 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*. W. H. Freeman. [关于专一性和编辑机理的第 13 章非常简要明了.]

Thompson, R. C., Dix, D. B., and Karim, A. M., 1986. The reaction of ribosomes with elongation factor Tu-GTP complexes. Aminoacyl-tRNA-independent reactions in the elongation cycle determine the accuracy of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 261 : 4868—4874.

Proud, C. G., 1986. Guanine nucleotides, protein phosphorylation, and the control of translation. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 73—77.

Moldave, K., 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 1109—1149.

Shatkin, A. J., 1985. mRNA cap binding proteins; essential factors for initiating translation. *Cell* 40 : 223—224.

Kozak, M., 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47 : 1—45.

## 第 31 章

Pfeffer, S. R., and Rothman, J. E., 1987. Biosynthetic protein transport by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 829—852.

- Wickner, W. T. , and Lodish, H. F. , 1985. Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230 : 400—407.
- Walter, P. , Gilmore, R. , and Blobel, G. , 1984. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38 : 5—8.
- Goldstein, J. L. , Brown, M. S. , Anderson, R. G. W. , Russell, D. W. , and Schneider, W. J. , 1985. Receptor-mediated endocytosis. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 1—39.
- Garoff, H. , 1985. Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in the eucaryotic cell. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 403—445.
- Schekman, R. , 1985. Protein localization and membrane traffic. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 115—143.
- Sabatini, D. D. , Kreibich, G. , Morimoto, T. , and Adesnik, M. , 1982. Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* 92 : 1—22.
- Kelly, R. B. , 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230 : 25—32.
- Perara, E. , Rothman, R. E. , and Lingappa, V. R. , 1986. Uncoupling translocation from translation; implications for transport of proteins across membranes. *Science* 232 : 348—352.
- Milligan, R. A. , and Unwin, P. N. T. , 1986. Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome. *Nature* 319 : 693—695. [结合在膜上的核糖体的结晶状簇的电镜分析和三维印象重构.]
- Friedlander, M. , and Blobel, G. , 1985. Bovine opsin has more than one signal sequence. *Nature* 318 : 338—343.
- Kurzchalia, T. V. , Wiedmann, M. , Girshovich, A. S. , Bochkareva, E. S. , Bielka, H. , and Rapoport, T. A. , 1986. The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature* 320 : 634—636.
- Lauffer, L. , Garcia, P. D. , Harkins, R. N. , Coussens, L. , Ullrich, A. , and Walter, P. , 1985. Topology of signal recognition particle receptor in endoplasmic reticulum membrane. *Nature* 318 : 334—338.
- Farquhar, M. G. , 1985. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 447—488.
- Rothman, J. E. , 1985. The compartmental organization of the Golgi apparatus. *Sci. Amer.* 253 (3) : 74—89.
- Griffiths, G. , and Simons, K. , 1986. The trans Golgi network; sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234 : 438—443.
- Dunphy, W. G. , and Rothman, J. E. , 1985. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* 42 : 13—21.
- von Figura, K. , and Hasilik, A. , 1986. Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 167—193.
- Hurt, E. C. , and van Loon, A. P. G. M. , 1986. How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 204—207.
- Schmidt, G. W. , and Mishkind, M. L. , 1986. The transport of proteins into chloroplasts. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 879—912.
- van Loon, A. P. G. M. , Brandli, A. W. , and Schatz, G. , 1986. The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. *Cell* 44 : 801—812.
- Schleyer, M. , and Neupert, W. , 1985. Transport of proteins into mitochondria; translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* 43 : 339—350.
- Eilers, M. , and Schatz, G. , 1986. Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* 322 : 228—232.

- Chen, W. -J., and Douglas, M., 1987. Phosphodiester bond cleavage outside mitochondria is required for the completion of protein import into the mitochondrial matrix. *Cell* 49 : 651—658.
- Dingwall, C., 1985. The accumulation of proteins in the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 64—66.
- De Robertis, E. M., 1983. Nucleocytoplasmic segregation of proteins and RNAs. *Cell* 32 : 1021—1025.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E., 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear-location. *Cell* 39 : 499—509.
- Richardson, W. D., Roberts, B. L., and Smith, A. E., 1986. Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell* 44 : 77—85.
- Benson, S. A., Hall, M. N., and Silhavy, T. J., 1985. Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli* K12. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 101—134.
- Randall, L. L., and Hardy, S. J. S., 1984. Export of protein in bacteria. *Microbiol. Rev.* 48 : 290—298.
- Coleman, J., Inukai, M., and Inouye, M., 1985. Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell* 43 : 351—360.
- Davis, N. G., and Model, P., 1985. An artificial anchor domain; hydrophobicity suffices to stop transfer. *Cell* 41 : 607—614.
- Kuhn, A., Wickner, W., and Kreil, G., 1986. The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain. *Nature* 322 : 335—339.
- Muller, M., and Blobel, G., 1984. In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81 : 7421—7425.
- Dautry-Varsat, A., and Lodish, H. F., 1984. How receptors bring proteins and particles into cells. *Sci. Amer.* 250 (5) : 52—58.
- Pastan, I., and Willingham, M. C., (eds.), 1985. *Endocytosis*. Plenum. [有关于这些题材的精采论文: 由受体中介的胞吞作用, 色涵素, 唾液糖蛋白受体, 毒素.]
- Pearse, B. M. F., and Crowther, R. A., 1987. Structure and assembly of coated vesicles. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16 : 49—68.
- Bretscher, M. S., and Pearse, B. M. F., 1984. Coated pits in action. *Cell* 38 : 3—4.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A., 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 663—700.
- Harrison, S. C., and Kirschhausen, T., 1983. Clathrin, cages, and coated vesicles. *Cell* 33 : 650—652.
- Ahle, S., and Ungewickell, E., 1986. Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J.* 5 : 3143—3149.
- Rothman, J. E., and Schmid, S. L., 1986. Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46 : 5—9.
- Bretscher, M. S., 1984. Endocytosis; relation to capping and cell locomotion. *Science* 224 : 681—686.
- Simons, K., Garoff, H., and Helenius, A., 1982. How an animal virus gets into and out of its host cell. *Sci. Amer.* 246 (2) : 58—66.
- Ward, W. H. J., 1987. Diphtheria toxin; a novel cytotoxic enzyme. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 28—31.
- Neville, Jr., D. M., and Hudson, T. H., 1986. Transmembrane transport of diphtheria toxin, related toxins, and colicins. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 195—224.
- Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F., and McKay, D. B., 1986. Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 1320—1324.
- Ciechanover, A., 1987. Regulation of the ubiquitin-mediated proteolytic pathway; role of the substrate  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>

group and of transfer RNA. *J. Cell. Biochem.* 34 : 81—100.

Waxman, L., and Goldberg, A. L., 1986. Selectivity of intracellular proteolysis: protein substrates activate the ATP-dependent protease La. *Science* 232 : 500—503.

Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A., 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234 : 179—186.

## 第 32 章

Ptashne, M., Johnson, A. D., and Pabo, C. O., 1982. A genetic switch in a bacterial virus. *Sci. Amer.* 247 (5) : 128—140.

Yanofsky, C., 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289 : 751—758.

Pabo, C. O., and Sauer, R. T., 1984. Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 293—321. [本文为一简明综述, 讨论阻遏物-操纵基因相互作用的 X 射线结晶学研究.]

Beckwith, J., Davies, J., and Gallant, J., (eds.), 1983. *Gene Function in Prokaryotes*. Cold Spring Harbor Laboratory. [有关于原核生物体内基因表达的控制的精采综述. 关于制动作用、地球上的控制系统、翻译的阻遏和重组调节的几章尤为中肯.]

Ptashne, M., 1986. *A Genetic Switch. Gene Control and Phage  $\lambda$* . Cell Press and Blackwell Scientific Publications. [关于  $\lambda$  噬菌体如何在两个发育途径之间来回转换的杰出著作.]

Schleif, R., 1986. *Genetics and Molecular Biology*. Addison-Wesley. [第 12、13、14 章是原核生物中基因调控主要概念的实验根据的精采论述.]

Jurnak, F. A., and McPherson, A., (eds.), 1985. *Biological Macromolecules and Assemblies. Volume 2: Nucleic Acids and Interactive Proteins*. Wiley-Interscience. [有关于 DNA-结合蛋白, 如  $\lambda$  阻遏物和 cro 蛋白, 的论文.]

Gottesman, S., 1984. Bacterial regulation: global regulatory networks. *Ann. Rev. Genet.* 18 : 415—422.

Takeda, Y., Ohlendorf, D. H., Anderson, W. F., and Matthews, B. W., 1983. DNA-binding proteins. *Science* 221 : 1020—1026.

Ptashne, M., 1986. Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 322 : 697—701.

McKay, D. B., Pickover, C. A., and Steitz, T. A., 1982. *Escherichia coli lac repressor is elongated with its operator DNA binding domains located at both ends.* *J. Mol. Biol.* 156 : 175—183.

de Crombrughe, B., Busby, S., and Buc, H., 1984. Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science* 224 : 831—838.

McKay, D. B., Weber, I. T., and Steitz, T. A., 1982. Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 257 : 9518—9524.

Weber, I. T., Takio, K., Titani, K., and Steitz, T. A., 1982. The cAMP-binding domains of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and the catabolite gene activator protein are homologous. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79 : 7679—7683.

Dunn, T. M., Hahn, S., Ogden, S., and Schleif, R. F., 1984. An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81 : 5017—5020.

Johnson, A. D., Poteete, A. R., Lauer, G., Sauer, R. T., Ackers, G. K., and Ptashne, M., 1981. Lambda repressor and cro—components of an efficient molecular switch. *Nature* 294 : 217—223.

Griffith, J., Hochschild, A., and Ptashne, M., 1986. DNA loops induced by cooperative binding of  $\lambda$  repressor. *Nature* 322 : 750—752.

Ohlendorf, D. H., Anderson, W. F., Lewis, M., Pabo, C. O., and Matthews, B. W., 1983. Comparison of the structures of cro and  $\lambda$  repressor proteins from bacteriophage  $\lambda$ . *J. Mol. Biol.* 169 : 757—769.

- Anderson, J. E. , Ptashne, M. , and Harrison, S. C. , 1985. A phage repressor-operator complex at 7 Å resolution. *Nature* 316 : 596—601.
- Wharton, R. P. , and Ptashne, M. , 1985. Changing the binding specificity of a repressor by redesigning an alpha-helix. *Nature* 316 : 601—605.
- Wharton, J. E. , Ptashne, M. , and Harrison, S. C. , 1987. Structure of the repressor-operator complex of bacteriophage 434. *Nature* 326 : 846—852.
- Schevitz, R. W. , Otwinowski, Z. , Joachimiak, A. , Lawson, C. L. , and Sigler, P. B. , 1985. The three-dimensional structure of *trp* repressor. *Nature* 317 : 782—786.
- Zhang, R. -g. , Joachimiak, A. , Lawson, C. L. , Schevitz, R. W. , Otwinowski, Z. , and Sigler, P. B. , 1987. The crystal structure of *trp* aporepressor at 1.8 Å shows how binding tryptophan enhances DNA affinity. *Nature* 327 : 591—597.
- Landick, R. , Carey, J. , and Yanofsky, C. , 1985. Translation activates the paused transcription complex and restores transcription of the *trp* operon leader region. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 4663—4667.
- Nomura, M. , Gourse, R. , and Baughman, G. , 1984. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 75—117.

### 第 33 章

- Kornberg, R. D. , and Klug, A. , 1981. The nucleosome. *Sci. Amer.* 244 (2) : 52—64.
- Gehring, W. J. , 1987. Homeo boxes in the study of development. *Science* 236 : 1245—1252.
- Grivell, L. A. , 1983. Mitochondrial DNA. *Sci. Amer.* 248 (3) : 78—89.
- Darnell, J. , Lodish, H. , and Baltimore, D. , 1986. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books.
- Watson, J. D. , Hopkins, N. H. , Roberts, J. W. , Steitz, J. A. , Weiner, A. M. , 1987. *Molecular Biology of the Gene* (4th ed. ). Benjamin/Cummings.
- Lewin, B. , 1987. *Genes* (3rd ed. ). Wiley.
- Cold Spring Harbor Symposia, 1985. *Molecular Biology of Development*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 50.
- Richmond, T. J. , Finch, J. T. , Rushton, B. , Rhodes, D. , and Klug, A. , 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311 : 532—537.
- Burlingame, R. W. , Love, W. E. , Wang, B-C. , Hamlin, R. , Xuong, N-h. , and Moudrianakis, E. N. , 1985. Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* 228 : 546—553. [还可参看 *Science* 229 : 1109—1113, 亦为此类结晶学研究的讨论.]
- Pedersen, D. S. , Thoma, F. , and Simpson, R. T. , 1986. Core particle, fiber, and transcriptionally active chromatin structure. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2 : 117—147.
- Sperling, R. , and Wachtel, E. J. , 1981. The histones. *Advan. Protein Chem.* 29 : 85—133.
- Borst, P. , and Grivell, L. A. , 1981. Small is beautiful—portrait of a mitochondrial genome. *Nature* 290 : 443—444.
- Anderson, S. , Bankier, A. T. , Barrell, B. G. , de Bruijn, M. H. L. , Coulson, A. R. , Drouin, J. , Eperon, I. C. , Nierlich, D. P. , Roe, B. A. , Sanger, F. , Schreier, P. H. , Smith, A. J. H. , Staden, R. , and Young, I. G. , 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 : 457—465.
- Challberg, M. D. , and Kelly, T. J. , 1982. Eukaryotic DNA replication: viral and plasmid model systems. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 901—934.
- Jelinek, W. R. , and Schmid, C. W. , 1982. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 813—844.

- Singer, M. F., and Skowronski, J., 1985. Making sense out of LINES: long interspersed repeat sequences in mammalian genomes. *Trends Biochem. Sci* 10 : 119—122.
- Schimke, R. T., 1984. Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 37 : 705—713.
- Stark, G. R., and Wahl, G. M., 1984. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 447—491.
- Blackburn, E. H., and Szostak, J. W., 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 163—194.
- Carbon, J., 1984. Yeast centromeres: structure and function. *Cell* 37 : 351—353.
- Newport, J. W., and Forbes, D. J., 1987. The nucleus: structure, function, and dynamics. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 535—566.
- Nelson, W. G., Pienta, K. J., Barrack, E. R., and Coffey, D. S., 1986. The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 457.
- Karlsson, S., and Nienhuis, A. W., 1985. Developmental regulation of human globin genes. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 1071—1108.
- Bunn, H. F., and Forget, B. G., 1986. *Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects*. Saunders. [这本优秀著作的第7章讨论珠蛋白基因的结构和表达.]
- Elgin, S. C. R., 1984. Anatomy of hypersensitive sites. *Nature* 309 : 213—214.
- Bird, A. P., 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 : 209—213.
- Hutchinson, N., and Weintraub, H., 1985. Localization of DNase I-sensitive sequences to specific regions of interphase nuclei. *Cell* 43 : 471—482.
- Brown, D. D., 1984. The role of stable complexes that repress and activate eucaryotic genes. *Cell* 37 : 359—365. [讨论 TFⅢA 与 5S RNA 基因的相互作用.]
- Miller, J., McLachlan, A. D., and Klug, A., 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* 4 : 1609—1614.
- Tso, J. Y., van den Berg, D. J., and Korn, L. J., 1986. Structure of the gene for *Xenopus* transcription factor IIIA. *Nucl. Acids Res.* 14 : 2187—2200.
- Berg, J. M., 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* 232 : 485—487.
- Rhodes, D., and Klug, A., 1986. An underlying repeat in some transcriptional control sequences corresponding to half a double helical turn of DNA. *Cell* 46 : 123—132.
- Chowdhury, K., Deutsch, U., and Gruss, P., 1987. A multigene family encoding several finger structures is present and differentially active in mammalian genomes. *Cell* 48 : 771—778.
- Gehring, W. J., 1985. The molecular basis of development. *Sci. Amer.* 253 (4) : 152—162.
- Bender, W., Akam, M., Karch, F., Beachy, P. A., Peifer, M., Spierer, P., Lewis, E. B., and Hogness, D. S., 1983. Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221 : 23—29.
- Gehring, W. J., 1985. The homeo box: a key to the understanding of development? *Cell* 40 : 3—5.
- Laughon, A., and Scott, M. P., 1984. Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature* 310 : 25—31.
- Desplan, C., Theis, J., and O'Farrell, P. H., 1985. The *Drosophila* developmental gene, *engrailed*, encodes a sequencespecific DNA binding activity. *Nature* 318 : 630—635.
- Manley, J. L., and Levine, M. S., 1985. The homeo box and mammalian development. *Cell* 43 : 1—2.
- Bendall, D. S., (ed.), 1983. *Evolution from Molecules to Men*. Cambridge University Press. [有许多篇关于分子进化论的引人入胜的论文.]
- Doolittle, R. F., 1986. *Of Urfs and Orfs: A Primer on How to Analyze Derived Amino Acid Sequences*. University



Science Books. [简明而又动人的著作, 列举有许多分子进化的有趣的例子.]

Wilson, A. C., 1985. The molecular basis of evolution. *Sci. Amer.* 253 (4) : 164—173.

Dickerson, R. E., and Geis, I., 1983. *Hemoglobin; Structure, Function, Evolution, and Pathology*. Benjamin/Cummings. [第3章为引人入胜的关于血红蛋白进化的论著.]

## 第 34 章

Hogle, J. M., Chow, M., and Filman, D. J., 1987. The structure of poliovirus. *Sci. Amer.* 256 (3) : 42—49.

Simons, K., Garoff, H., and Helenius, A., 1982. How an animal virus gets into and out of its host cell. *Sci. Amer.* 246 (2) : 58—66.

Varmus, H. E., 1987. Reverse transcription. *Sci. Amer.* 257 (3) : 56—64.

Bishop, J. M., 1987. The molecular genetics of cancer. *Science* 235 : 305—311.

Gallo, R. C., 1987. The AIDS virus. *Sci. Amer.* 256(1) : 46—56.

Fields, B. N., and Knipe, D. M., (eds.), 1986. *Fundamental Virology*. Raven Press. [有内容丰富的关于动物病毒的论文.]

Botchan, M., Grodzicker, T., and Sharp, P. A., (eds.), 1986. *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Weiss, R., (ed.), 1982. *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Jurnak, F. A., and McPherson, A., (eds.), 1984. *Biological Macromolecules and Assemblies. Volume 1; Virus Structure*. Wiley. [有杰出的论著讨论本章所涉及的几种病毒的结构.]

Hogle, J. M., Chow, M., and Filman, D. J., 1985. Threedimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229 : 1358—1365.

Smith, T. J., Kremer, M. J., Luo, M., Vriend, G., Arnold, E., Kamer, G., Rossmann, M. G., McKinlay, M. A., Diana, G. D., and Otto, M. J., 1986. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science* 233 : 1286—1293.

Erickson, J. W., Silva, A. M., Murthy, M. R. N., Fita, I., and Rossmann, M. G., 1985. The structure of a T=1 icosahedral empty particle from Southern bean mosaic virus. *Science* 229 : 625—629.

Namba, K., and Stubbs, G., 1986. Structure of tobacco mosaic virus at 3.6 Å resolution; implications for assembly. *Science* 231 : 1401—1406.

Harrison, S. C., 1984. Multiple modes of subunit association in the structures of simple viruses. *Trends Biochem. Sci.* 9 : 345—351.

Lamb, R. A., and Choppin, P. W., 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 467—506.

Arnold, E., Luo, M., Vriend, G., Rossmann, M. G., Palmenberg, A. C., Parks, G. D., Nicklin, M. J. H., and Wimmer, E., 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84 : 21—25.

Eigen, M., 1983. Self-replication and molecular evolution. In Bendall, D. S., (ed.), *Evolution from Molecules to Men*, pp. 105—130. Cambridge University Press.

Dinter-Gottlieb, G., 1986. Viroids and virusoids are related to group I introns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 6250—6254.

Riesner, D., and Gross, H. J., 1985. Viroids. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 531—564.

Marmamorosch, K., 1987. The curse of cadang-cadang. *Natural History* 96 (7) : 20—22. [关于一种病毒引起的一种疾病的传染病的引人入胜的论文.]

- Sadowski, P., 1986. Site-specific recombinases; changing partners and doing the twist. *J. Bacteriol.* 165 : 341—347.
- Weinberg, R. A., 1983. A molecular basis of cancer. *Sci. Amer.* 249 (5) : 126—142.
- Hunter, T., 1984. The proteins of oncogenes. *Sci. Amer.* 251 (2) : 70—79.
- Barbacid, M., 1987. Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 779—828.
- Croce, C. M., and Klein, G., 1985. Chromosome translocations and human cancer. *Sci. Amer.* 252 (3) : 54—60.
- Bishop, J. M., 1985. Viral oncogenes. *Cell* 42 : 23—38.
- Doolittle, R. F., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Devare, S. G., Robbins, K. C., Aaronson, S. A., and Antoniades, H. N., 1983. Simian sarcoma *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221 : 275—277.
- Kingston, R. E., Baldwin, A. S., and Sharp, P. A., 1985. Transcription control by oncogenes. *Cell* 41 : 3—5.
- Chen, I. S. Y., 1986. Regulation of AIDS virus expression. *Cell* 47 : 1—2.
- Mitsuya, H., and Broder, S., 1987. Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature* 325 : 773—778.
- Coffin, J. M., 1986. Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* 46 : 1—4.
- Rabson, A. B., and Martin, M. A., 1985. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* 40 : 477—480.
- Laurence, J., 1985. The immune system in AIDS. *Sci. Amer.* 253 (6) : 84—93.
- Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R., 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47 : 333—348.
- Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C., and Samuel, C. E., 1987. Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 727—778.
- Lengyel, P., 1982. Biochemistry of interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 251—282.

## 第 35 章

- Tonegawa, S., 1985. The molecules of the immune system. *Sci. Amer.* 253 (4) : 122—131.
- Leder, P., 1982. The genetics of antibody diversity. *Sci. Amer.* 246 (5) : 102—115.
- Ada, G. L., and Nossal, G., 1987. The clonal selection theory. *Sci. Amer.* 257 (2) : 62—69.
- Hood, L. E., Weissman, I. L., Wood, W. B., and Wilson, J. H., 1984. *Immunology* (2nd ed.). Benjamin.
- [关于分子和细胞免疫学的流暢易懂、可读性极高的著作。]
- Nisino, A., 1985. *Introduction to Molecular Immunology* (2nd ed.). Sinauer. [简明而又寓意深远的导论。]
- Weir, D. M., (ed.), 1986. *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford University Press.
- Paul, W. E., (ed.), 1984. *Fundamental Immunology*. Raven Press.
- Annual Review of Immunology*. [有许多关于分子和细胞免疫学各个方面的杰出综述。第1卷于1983年问世。]
- Davies, D. R., and Metzger, H., 1983. Structural basis of antibody function. *Ann. Rev. Immunol.* 1 : 87—117.
- Huber, R., 1980. Spatial structure of immunoglobulin molecules. *Klin. Wochenschr.* 58 : 1217—1231.
- Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. V., and Poljak, R. J., 1987. The structural basis of antigen-antibody recognition. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 16 : 139—159.

- Amit, A. G. , Mariuzza, R. A. , Phillips, S. E. V. , and Poljak, R. J. , 1986. Three-dimensional structure of an antigenantibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* 233 : 747—753.
- Colman, P. M. , Laver, W. G. , Varghese, J. N. , Baker, A. T. , Tulloch, P. A. , Air, G. M. , Webster, R. G. , 1987. Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. *Nature* 326 : 356—363.
- Reid, K. B. , 1986. Activation and control of the complement system. *Essays Biochem.* 22 : 27—68.
- Müller-Eberhard, H. J. , 1986. The membrane attack complex of complement. *Ann. Rev. Immunol.* 4 : 503—528.
- Reid, K. B. M. , and Porter, R. R. , 1981. The proteolytic activation systems of complement. *Ann. Rev. Biochem.* 50 : 433—464.
- Metzger, H. , Alcaraz, G. , Hohman, R. , Kinet, J. P. , Pribluda, V. , Quarto, R. , 1986. The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Ann. Rev. Immunol.* 4 : 419—470.
- Honjo, T. , and Habu, S. , 1985. Origin of immune diversity; genetic variation and selection. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 803—830.
- Berek, C. , Griffiths, G. M. , and Milstein, C. , 1985. Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature* 316 : 412—418.
- Shimizu, A. , and Honjo, T. , 1984. Immunoglobulin class switching. *Cell* 36 : 801—803.
- Tonegawa, S. , 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302 : 575—581.
- Bjorkman, P. J. , Saper, M. A. , Samraoui, B. , Bennett, W. S. , Strominger, J. L. , and Wiley, D. C. , 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329 : 506—512.
- Widera, G. , 1986. Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science* 233 : 437—443.
- Becker, J. W. , and Reeke, G. N. Jr. , 1985. Three-dimensional structure of  $\beta_2$ -microglobulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 4225—4229.
- Allison, J. P. , and Lanier, L. L. , 1987. The structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Ann. Rev. Immunol.* 5 : 503—540.
- Hedrick, S. M. , Cohen, D. I. , Nielsen, E. A. , and Davis, M. M. , 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308 : 149—152.
- Hood, L. , Kronenberg, M. , and Hunkapiller, T. , 1985. T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 40 : 225—229.
- Novotny, J. , Tonegawa, S. , Saito, H. , Kranz, D. M. , and Eisen, H. N. , 1986. Secondary, tertiary, and quaternary structures of the T-cell-specific immunoglobulin-like polypeptide chains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 742—746.
- Fink, P. J. , Matis, L. A. , McElligott, D. L. , Bookman, M. , and Hedrick, S. M. , 1986. Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor. *Nature* 321 : 219—226.
- Goverman, J. , Hunkapiller, T. , and Hood, L. , 1986. A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. *Cell* 45 : 475—484.
- Hunkapiller, T. , and Hood, L. , 1986. The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature* 323 : 15—16.
- Kohler, G. , 1986. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Science* 233 : 1281—1286.
- Milstein, C. , 1986. From antibody structure to immunological diversification of immune response. *Science* 231 : 1261—1268.

## 第 36 章

- Eisenberg, E. , and Hill, T. L. , 1985. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems.

*Science* 227 : 999—1006.

Weber, K. , and Osborn, M. , 1985. The molecules of the cell matrix. *Sci. Amer.* 253 (4) : 110—120.

Dustin, P. , 1980. Microtubules. *Sci. Amer.* 243 (2) : 66—76.

Vale, R. D. , Scholey, J. M. , and Sheetz, M. P. , 1986. Kinesin: possible roles for a new microtubule motor.

*Trends Biochem. Sci.* 11 : 464—468.

Kirschner, M. , and Mitchison, T. , 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45 : 329—342.

Bagshaw, C. R. , 1982. *Muscle Contraction*. Chapman and Hall. [简明而又内容丰富的导论.]

Squire, J. M. , 1986. *Muscle: Design, Diversity, and Disease*. Benjamin/Cummings.

Pollack, G. H. , and Sugi, H. , (eds. ) , 1984. *Contractile Mechanisms in Muscle*. Plenum.

Warrick, H. M. , and Spudich, J. A. , 1987. Myosin: structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3 : 379—422.

McLachlan, A. D. , 1984. Structural implications of the myosin amino acid sequence. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13 : 167—189.

Milligan, R. A. , and Flicker, P. F. , 1987. Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryoelectron microscopy. *J. Cell. Biol.* 105 : 29—39.

Kabsch, W. , Mannherz, H. G. , and Suck, D. , 1985. Three-dimensional structure of the complex of actin and DNase I at 4.5 Å resolution. *EMBO J.* 4 : 2113—2118.

Sheetz, M. P. , and Spudich, J. A. , 1983. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature* 303 : 31—35.

Honda, H. , Nagashima, H. , and Asakura, S. , 1986. Directional movement of F-actin in vitro. *J. Mol. Biol.* 191 : 131—133.

Kron, S. J. , and Spudich, J. A. , 1986. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 6272—6276.

Hynes, T. R. , Block, S. M. , White, B. T. , and Spudich, J. A. , 1987. Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* 48 : 953—963.

Hibberd, M. G. , and Trentham, D. R. , 1986. Relationships between chemical and mechanical events during muscular contraction. *Ann. Rev. Biophys. Biochem.* 15 : 119.

Cooke, R. , 1986. The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21 : 53—118.

Thomas, D. D. , 1987. Spectroscopic probes of muscle crossbridge rotation. *Ann. Rev. Physiol.* 49 : 691—709.

Kress, M. , Huxley, H. E. , Faruqi, A. R. , and Hendrix, J. , 1986. Structural changes during activation of frog muscle studied by time-resolved x-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 188 : 325—342.

Sundaralingam, M. , Bergstrom, R. , Strasburg, G. Rao, S. T. , Roychowdhury, P. , Greaser, M. , and Wang, B. C. , 1985. Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3-angstrom resolution. *Science* 227 : 945—948.

Herzberg, O. , Moulton, J. , and James, M. N. G. , 1985. Calcium binding to skeletal muscle troponin C and the regulation of muscle contraction. *Ciba Found. Symp.* 122 : 120—144.

Reinach, F. C. , Nagai, K. , and Kendrick-Jones, J. , 1986. Sitedirected mutagenesis of the regulatory light-chain  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  binding site and its role in hybrid myosins. *Nature* 322 : 80—83.

White, S. P. , Cohen, C. , and Phillips, G. N. , Jr. , 1987. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 325 : 826—828.

Pollard, T. D. , and Cooper, J. A. , 1986. Actin and actinbinding proteins. A critical evaluation of mechanisms

and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 987.

Stossel, T. P., Chaponnier, C., Ezzell, R. M., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J., Lind, S. E., Smith, D. B., Southwick, F. S., Yin, H. L., and Zaner, K. S., 1985. Nonmuscle actin-binding proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 353—402.

Weeds, A., 1982. Actin-binding proteins-regulators of cell architecture and motility. *Nature* 296 : 811—816.

Johnson, K. A., 1985. Pathway of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: a comparison with actomyosin. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 : 161—188.

Goodenough, U. W., and Heuser, J. E., 1985. Outer and inner dynein arms of cilia and flagella. *Cell* 41 : 341—342.

Afzelius, B., 1985. The immotile-cilia syndrome: a microtubule-associated defect. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 19 : 63—87.

Vale, R. D., Schnapp, B. J., Reese, T. S., and Sheetz, M. P., 1985. Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell* 40 : 559—569.

Schnapp, B. J., Vale, R. D., Sheetz, M. P., and Reese, T. S., 1985. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40 : 455—462.

Horio, T., and Hotani, H., 1986. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321 : 605—607.

Steinert, P. M., and Parry, D. A. D., 1985. Intermediate filaments. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 41—65.

Weber, K., and Geisler, N., 1985. Intermediate filaments: structural conservation and divergence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455 : 649—668.

Wang, K., 1986. Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. *Cell Muscle Motility* 6 : 315—369.

## 第 37 章

Pedersen, P. L., and Carafoli, E., 1987. Ion motive ATPases. *Trends Biochem. Sci.* 12 : 146—150 and 12 : 186—189. [关于 ATP 推动的离子泵的流畅易懂的概论, 重点是一般特性.]

Jay, D., and Cantley, L., 1986. Structural aspects of the red cell anion exchange protein. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 511—538.

Stoeckenius, W., 1985. The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaebacterium. *Trends Biochem. Sci.* 10 : 483—486.

Tonomura, Y., 1986. *Energy-transducing ATPases—Structure and Kinetics*. Cambridge University Press. [关于与细胞运动、氧化磷酸化和跨膜转运有关的 ATP 酶的催化和转化能量机理的简明而又内容丰富的著作.]

Harold, F. M., 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*. W. H. Freeman. [第 5 章为膜转运中的能量转换, 可读性高.]

Martonosi, A. N., (ed.), 1985. *The Enzymes of Biological Membranes* (2nd ed.). Plenum. [第 3 卷有多篇关于原核的和真核的膜中转运体的精采论文.]

Poste, G., and Crooke, S. T., (eds.), 1986. *New Insights into Cell and Membrane Transport Processes*. Plenum.

Senenza, G., and Kinne, R., 1985. *Membrane Transport Driven by Ion Gradients*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 456.

Andreoli, T. E., Hoffman, J. F., and Fanestil, D. D., (eds.), 1986. *Physiology of Membrane Disorders* (2nd ed.). Plenum.

Tanford, C., 1983. Mechanism of free energy coupling in active transport. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 379—

- Jencks, W. P., 1982. Rules and the economics of energy balance in coupled vectorial processes. In Martonosi, A. N., (ed.), *Membranes and Transport*, vol. 1, pp. 515—520. Plenum.
- Eisenberg, E., and Hill, T. L., 1985. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. *Science* 227 : 999—1006.
- Shull, G. E., Schwartz, A., and Lingrel, J. B., 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$  ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* 316 : 691—695.
- Cantley, L. C., 1981. Structure and mechanism of the  $(\text{Na} - \text{K}) - \text{ATPase}$ . *Curr. Top. Bioenerg.* 11 : 201—237.
- Carafoli, E., 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 395—433.
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., and Green, N. M., 1985. Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316 : 696—700.
- Pickart, C. M., and Jencks, W. P., 1984. Energetics of the calcium-transporting ATPase. *J. Biol. Chem.* 259 : 1629—1643.
- Wright, J. K., Seckler, R., and Overath, P., 1986. Molecular aspects of sugar: ion cotransport. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 225—248.
- Semenza, G., Kessler, M., Hosang, M., Weber, J., and Schmidt, U., 1984. Biochemistry of the  $\text{Na}^+$ , D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 779 : 343—379.
- Kaback, H. R., 1986. Active transport in *Escherichia coli*: passage to permease. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 279—319.
- Ferro-Luzzi Ames, G., 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 397—425.
- Saier, M. H., Jr., 1987. *Enzymes in Metabolic Pathways; A Comparative Study of Mechanism, Structure, Evolution, and Control*. Harper & Row. [第5章有关于细菌中糖转运的有趣的讨论.]
- Bouma, C. L., Meadow, N. D., Stover, E. W., and Roseman, S., 1987. II-B<sup>9</sup><sub>1c</sub>, a glucose receptor of the bacterial phosphotransferase system; molecular cloning of the *pts G* and purification of the receptor from an overproducing strain of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84 : 930—934.
- Nassal, M., Mogi, T., Karnik, S. S., and Khorana, H. G., 1987. Structure-function studies on bacteriorhodopsin. III. Total synthesis of a gene for bacterio-opsin and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262 : 9264—9270.
- Stoeckenius, W., and Bogomolni, R. A., 1982. Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 587—616.
- Smith, S. O., Hornung, I., van der Steen, R., Pardo, J. A., Braiman, M. S., Lugtenburg, J., and Mathies, R. A., 1986. Are C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> single bond isomerizations of the retinal chromophore involved in the proton-pumping mechanism of bacteriorhodopsin? *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 967—971. [报告共振拉曼光谱研究, 证明原初步骤是 C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub> 顺-反异构化作用.]
- Lanyi, J. K., 1986. Halorhodopsin; a light-driven chloride ion pump. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 : 11—28.
- Blanck, A., and Oesterhelt, D., 1987. The halo-opsin gene II. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. *EMBO J.* 6 : 265—273.
- Kopito, R. R., and Lodish, H. F., 1985. Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* 316 : 234—238.

Falke, J. J., Pace, R. J., and Chan, S. I., 1984. Chloride binding to the anion transport binding sites of band 3. A  $^{35}\text{Cl}$  NMR study. *J. Biol. Chem.* 259 : 6472—6480.

Unwin, P. N. T., and Ennis, P. D., 1984. Two configurations of a channel-forming membrane protein. *Nature* 307 : 609—613.

Young, J. D., Cohn, Z. A., and Gilula, N. B., 1987. Functional assembly of gap junction conductance in lipid bilayers: demonstration that the major 27 kd protein forms the junctional channel. *Cell* 48 : 733—743.

Paul, D. L., 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103 : 123—134.

Loewenstein, W. R., 1981. The cell-to-cell channel. *Fed. Proc.* 37 : 2645—2650.

Spray, D. C., Stern, J. H., Harris, A. L., and Bennett, M. V. L., 1982. Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to  $\text{H}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79 : 441—445.

Dobler, M., 1981. *Ionophores and Their Structures*. Wiley-Interscience. [关于转运抗生素和其它离子载体的图文并茂的著作.]

Anderson, O. S., 1984. Gramicidin channels. *Ann. Rev. Physiol.* 46 : 531—548.

## 第 38 章

Berridge, M. J., 1985. The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Amer.* 253 (4) : 142—152.

Snyder, S. H., 1985. The molecular basis of communication between cells. *Sci. Amer.* 253 (4) : 132—140.

Stryer, L., and Bourne, H. R., 1986. G proteins: a family of signal transducers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2 : 391—419.

Nishizuka, Y., 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233 : 305—312.

Carafoli, E., and Penniston, J. T., 1985. The calcium signal. *Sci. Amer.* 253 (5) : 70—78.

Greenspan, F. S., and Forsham, P. H., (eds.) 1986. *Basic and Clinical Endocrinology* (2nd ed.). Lange. [简明导论, 重点是人体内分泌学及病症.]

Levitzki, A., 1984. *Receptors: A Quantitative Approach*. Benjamin/Cummings.

Bradshaw, R. A., and Gill, G. N., (eds.), 1983. *Evolution of Hormone-Receptor Systems*. Liss.

Chadwick, C. M. and Garrod, D. R., (eds.), 1986. *Hormones, Receptors, and Cellular Interactions in Plants*. Cambridge University Press.

Gilman, A. G., 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 615—649.

Schramm, M., and Selinger, Z., 1984. Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system. *Science* 225 : 1350—1356.

Feder, D., Im, M. -J., Klein, H. W., Hekman, M., Holzhofer, A., Dees, C., Levitzki, A., Helmreich, E. J. M., and Pfeuffer, T., 1986. Reconstitution of  $\beta_1$ -adrenoceptor-dependent adenylate cyclase from purified components. *EMBO J.* 5 : 1509—1514.

Brandt, D. R., Asano, T., Pedersen, S. E., and Ross, E. M., 1983. Reconstitution of catecholamine-stimulated GTPase activity. *Biochemistry* 22 : 4357—4362.

Dohlman, H. G., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., 1987. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26 : 2657—2664.

Beñovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J., 1986.  $\beta$ -Adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist occupied form of the receptor. *Proc. Nat. Acad.*

Sci. 83 : 2797—2801.

Gerisch, G. , 1987. Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 853—879.

Berridge, M. J. , 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 159—193.

Majerus, P. W. , Connolly, T. M. , Deckmyn, H. , Ross, T. S. , Bross, T. E. , Ishii, H. , Bansal, V. S. , and Wilson, D. B. , 1986. The metabolism of phosphoinositide - derived messenger molecules. *Science* 234 : 1519—1526.

Woods, N. M. , Cuthbertson, S. R. , and Cobbold, P. H. , 1986. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319 : 600—602.

Hokin, L. E. , 1985. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 54 : 205—235.

Irvine, R. F. , Letcher, A. J. , Heslop, J. P. , and Berridge, M. J. , 1986. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway—demonstration of Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub>3-Kinase activity in animal tissues. *Nature* 320 : 631—634.

Wakelam, M. J. O. , Davies, S. A. , Houslay, M. D. , McKay, I. , Marshall, C. J. , and Hall, A. , 1986. Normal p21<sup>N-ras</sup> couples bombesin and other growth factor receptors to inositol phosphate production. *Nature* 323 : 173—176.

Bell, R. M. , 1986. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45 : 631—632.

Parthasarathy, R. , and Eisenberg, F. , Jr. , 1986. The inositol phospholipids: a stereochemical view of biological activity. *Biochem. J.* 235 : 313—322.

Hammarstrom, S. , 1983. Leukotrienes. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 355—377.

Smith, W. L. , and Borgeat, P. , 1985. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and hydroxyeicosanoic acids. In Vance, D. E. , and Vance, J. E. , (eds. ), *Biochemistry of Lipids and Membranes*, pp. 325—360. Benjamin/Cummings.

James, R. , and Bradshaw, R. A. , 1984. Polypeptide growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 259—292.

Kurachi, K. , Davie, E. W. , Strydom, D. J. , Riordan, J. F. , and Vallee, B. L. , 1985. Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochemistry* 24 : 5494—5499.

Ross, R. , Raines, E. W. , and Bowen-Pope, D. F. , 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46 : 155—169.

Stoscheck, C. M. , and King, Jr. , L. E. , 1986. Functional and structural characteristics of EGF and its receptor and their relationship to transforming proteins. *J. Cellul. Biochem.* 31 : 135—152.

Orci, L. , Ravazzola, M. , Storch, M. -J. , Anderson, R. G. W. , Vassalli, J. -D. , and Perrelet, A. , 1987. Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell* 49 : 865—868.

Carpenter, G. , 1987. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 881—914.

Ullrich, A. , Coussens, L. , Hayflick, J. S. , Dull, T. J. , Gray, A. , Tam, A. W. , Lee, J. , Yarden, Y. , Libermann, T. A. , Schlessinger, J. , Diwnward, J. , Mayes, E. L. V. , Whittle, N. , Waterfield, M. D. , and Seeburg, P. H. , 1984. Human epidermal growth factor cDNA sequence and aberrant expression in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309 : 418—425.

Ebina, Y. , Ellis, L. , Jarnagin, K. , Edery, M. , Graf, L. , Clauser, E. , Ou, J. , Masiarz, F. , Kan, Y. W. , Goldfine, I. D. , Roth, R. A. , and Rutter, W. J. , 1985. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40 : 747—758.



White, M. F., Maron, R., and Kahn, C. R., 1985. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318 : 183—186.

Riedel, H., Dull, D. J., Schlesinger, J., and Ullrich, A., 1986. A chimaeric receptor allows insulin to stimulate tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor. *Nature* 324 : 68—70.

Chao, M. V., Bothwell, M. A., Ross, A. H., Koprowski, H., Lanahan, A. A., Buck, C. R., and Sehgal, A., 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232 : 518—521.

Weinberger, C., Giguere, V., Hollenberg, S., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M., 1986. Human steroid receptors and *erb A* proto-oncogene products: members of a new superfamily of enhancer binding proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 : 759—772.

Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M., 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46 : 645—652.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. -M., Argos, P., and Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature* 320 : 134—139.

Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318 : 635—641.

Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennström, B., 1986. The *c-erb-A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324 : 635—640.

McDonnell, D. P., Mangelsdorf, D. J., Pike, J. W., Haussler, M. R., and O'Malley, B. W., 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* 235 : 1214—1217.

Douglass, J., Civelli, O., and Herbert, E., 1984. Polypeptide gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Ann. Rev. Biochem.* 53 : 665—715.

Samuelsson, B., 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220 : 568—575.

Cohen, S., 1986. Epidermal growth factor. *Biosci. Rep.* 6 : 1017—1028.

Levi-Montalcini, R., 1987. The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* 6 : 1145—1154.

## 第 39 章

Numa, S., 1986. Molecular basis for the function of ionic channels. *Biochem. Soc. Symp.* 52 : 119—143.

Snyder, S. H., 1985. The molecular basis of communication between cells. *Sci. Amer.* 253 (4) : 132—140.

Stryer, L., 1987. The molecules of visual excitation. *Sci. Amer.* 255 (7) : 42—50.

Hille, B., 1984. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer. [关于概念、实验方法和通道性质的杰出著作。一本饶有兴味的书。]

Miller, C., 1986. *Ion Channel Reconstitution*. Plenum. [有许多篇精采论文，是关于通道的纯化和重建的，详细讨论了钠通道和乙酰胆碱受体。]

Sakmann, B., and Neher, E., (eds.), 1983. *Single-channel Recording*. Plenum. [在这本重要的书中讨论了许许多点接触-夹技术的许多有趣的应用。]

Kuffler, S. W., Nicholls, J. G., and Martin, A. R., 1984. *From Neuron to Brain* (2nd ed.). Sinauer. [这本优秀著作的第Ⅱ部分有一篇关于神经元发出信号的机理的杰出论文。]

Cold Spring Harbor Symposium, 1983. *Molecular Neurobiology*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Volume 48. [有许多关于膜通道和感官系统的杰出论文。]

Hazelbauer, G. L., and Harayama, S., 1983. Sensory transduction in bacterial chemotaxis. *Int. Rev. Cytol.*

- McNab, R. M. , and Aizawa, S. -I. , 1984. Bacterial motility and the flagellar motor. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13 : 51—83.
- Koshland, D. E. , Jr. , Russo, A. F. , and Gutterson, N. I. , 1983. Information processing in a sensory system. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48 : 805—810.
- Segall, J. E. , Block, S. M. , and Berg, H. C. , 1986. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 8987—8991.
- Khan, S. , and Macnab, R. M. , 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility. *J. Mol. Biol.* 138 : 599—614.
- Meister, M. , Lowe, G. , and Berg, H. C. , 1987. The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell* 49 : 643—650.
- Krikos, A. , Conley, M. P. , Boyd, A. , Berg, H. C. , and Simon, M. I. , 1985. Chimeric chemosensory transducers of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 1326—1330.
- Bogonez, E. , and Koshland, D. E. , Jr. , 1985. Solubilization of a vectorial transmembrane receptor in functional form; aspartate receptor of chemotaxis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 4891—4895.
- Wolfe, A. J. , Conley, M. P. , Kramer, T. J. , and Berg, H. C. , 1987. Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis. *J. Bacteriol.* 169 : 1878—1885.
- Ravid, S. , Matsumura, P. , and Eisenbach, M. , 1986. Restoration of flagellar clockwise rotation in bacterial envelopes by insertion of the chemotaxis protein che Y. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 7157—7161.
- Catterall, W. A. , 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 953—985.
- Kao, C. Y. , and Levinson, S. R. , (eds. ) , 1986. *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium Channel*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Volume 479.
- Noda, M. , Ikeda, T. , Suzuki, H. , Takeshima, H. , Takahashi, T. , Kuno, M. , and Numa, S. , 1986. Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 322 : 826—828.
- Hartshorne, R. P. , Keller, B. U. , Talvenheimo, J. A. , Catterall, W. A. , and Montal, M. , 1985. Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82 : 240—244.
- Stroud, R. M. , and Finer-Moore, J. , 1985. Acetylcholine receptor structure, function, and evolution. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 : 317—351.
- Brisson, A. , and Unwin, P. N. T. , 1985. Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315 : 474—477.
- Colquhoun, D. , and Sakmann, B. , 1981. Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels. *Nature* 294 : 464—466.
- Sakmann, B. , Methfessel, C. , Mishina, M. , Takahashi, T. , Takai, T. , Kurasaki, M. , Fukuda, K. , and Numa, S. , 1985. Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel. *Nature* 318 : 538—543.
- Hess, G. P. , Kolb, H. A. , Lauger, P. , Schoffeniels, E. , and Schwarze, W. , 1984. Acetylcholine receptor (from *Electrophorus electricus*): a comparison of single-channel current recordings and chemical kinetic measurements. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81 : 5281—5285.
- Huganir, R. L. , Delcour, A. H. , Greengard, P. , and Hess, G. P. , 1986. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 321 : 774—776.
- Schofield, P. R. , Darlison, M. G. , Fujita, N. , Burt, D. R. Stephenson, F. A. , Rodriguez, H. , Rhee, L. M. Ramachandran, J. , Reale, V. , Glencores, T. A. , Seeburg, P. H. , and Barnard, E. A. , 1987. Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328 : 221—227.

- Grenningloh, G. , Rienitz, A. , Schmitt, B. , Methfessel, C. , Zensen, M. , Beyreuther, K. , Gundelfinger, E. D. , and Betz, H. , 1987. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328 : 215—220.
- Schnapf, J. L. , and Baylor, D. A. , 1987. How photoreceptor cells respond to light. *Sci. Amer.* 256 (4) : 40—47. [关于杆细胞和锥细胞的电生理学的通俗易懂的文章.]
- Stryer, L. , 1986. Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neurosci.* 9 : 87—119.
- Chabre, M. , 1985. Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 : 331—360.
- Fesenko, E. E. , Kolesnikov, S. S. , and Lyubarsky, A. L. , 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segments. *Nature* 313 : 310—313.
- Ovchinnikov, Yu. A. , 1982. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett.* 148 : 179—191.
- Miller, W. H. , (ed. ), 1981. *Molecular Mechanisms of Photoreceptor Transduction*. Academic Press.
- Fung, B. -K. , Hurley, J. B. , and Stryer, L. , 1981. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78 : 152—156.
- Nathans, J. , 1987. Molecular biology of visual pigments. *Ann. Rev. Neurosci.* 10 : 163—194.
- Nathans, J. , Thomas, D. , and Hogness, D. S. , 1986. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232 : 193—202.

# 选读文献 (第二版)

## 第 2 章

### 入门读物

Dickerson, R. E. and Geis, I., forthcoming. *Proteins: Structure, Function, and Evolution* (蛋白质: 结构、功能和进化). Benjamin. [这是一本清晰易懂的蛋白质入门书.]

Moore, S., and Stein, W. H., 1973. Chemical structures of pancreatic ribonuclease and deoxyribonuclease (胰核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶的化学结构). *Science* 180: 458—464.

Anfinsen, C. B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains (支配蛋白质链折叠的原理). *Science* 181: 223—230.

### 蛋白质化学的专著

Cantor, C. R., and Schimmel, P. R., 1980. *Biophysical Chemistry* (生物物理化学). Freeman. [第一篇的第二和第五章, 第三篇的第二十和二十一章对蛋白质的构象原理作了十分出色的说明.]

Cooper, T. G., 1977. *The Tools of Biochemistry* (生物化学工具). Wiley. [对蛋白质化学和生物化学的其他领域的实验方法作了有益的指导, 并清楚地介绍了实验步骤的原理.]

Neurath, H., and Hill, R. L., (eds.), 1976. *The Proteins* (3rd ed.). (蛋白质, 第三版). Academic Press. [包含许多好文章的多卷论文集.]

Haschemeyer, R. H., and Haschemeyer, A. E. V., 1973. *Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods* (蛋白质: 物理和化学方法研究指导). Wiley-Interscience.

Hirs, C. H. W., and Timasheff, S. N., (eds.), 1977. *Enzyme Structure, Part E. Methods in Enzymology*, vol. 47 (酶结构, 第 E 部分, 酶学方法, 第 47 卷). Academic Press. [出色地收集了关于氨基酸分析、端基方法、化学的和酶的裂解、肽分离、顺序分析、化学修饰和肽合成的权威性文章.]

Schultz, G. E., and Schirmer, R. H., 1979. *Principles of Protein Structure* (蛋白质结构的原理). Springer-Verlag.

### 氨基酸顺序测定

Konigsberg, W. H., and Steinman, H. M., 1977. Strategy and methods of sequence analysis (顺序分析的战略和方法). In Neurath, H., and Hill, R. L., (eds.), *The Proteins* (3rd ed.), (蛋白质, 第三版) vol. 3, pp. 1—178. Academic Press.

Niall, H., 1977. Automated methods for sequence analysis (顺序分析的自动方法). In Neurath, H., and Hill, R. L., (eds.), *The Proteins* (3rd ed.) (蛋白质, 第三版), vol. 3, pp. 179—238. Academic Press.

Needleman, S. B., (ed.), 1977. *Advanced Methods in Protein Sequence Determination* (蛋白质顺序测定的现代方法). Springer-Verlag.

Dayhoff, M. O., (ed.), 1972. *Atlas of Protein Sequence and Structure* (蛋白质顺序和结构图

表集). National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland. [一本包含所有已知氨基酸顺序的汇编, 很有价值, 该图表集每隔几年修订一次.]

### 蛋白质的共价修饰

Uy, R., and Wold, F., 1977. Post-translational covalent modification of proteins (蛋白质翻译后的共价修饰). *Science* 198:890—896.

Hershko, A., and Fry, M., 1975. Post-translational cleavage of polypeptide chains: role in assembly (多肽链翻译后的断裂: 装配中的作用). *Ann. Rev. Biochem.* 44: 775—797.

Glazer, A. N., Delange, R. J., and Sigman, D. S., 1975. *Chemical Modification of Proteins* (蛋白质的化学修饰). North-Holland.

### 蛋白质的折叠

Creighton, T. E., 1978. Experimental studies of protein folding and unfolding (蛋白质的折叠和伸展的实验研究). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33: 231—297.

Baldwin, R. L., 1975. Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding (蛋白质折叠反应的中间体和折叠机理). *Ann. Rev. Biochem.* 44:453—475.

Chou, P. Y., and Fasman, C. D., 1978. Empirical predictions of protein conformation (蛋白质构象的经验预测). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251—276.

Sternburg, M. J. E., and Thornton, J. M., 1978. Prediction of protein structure from amino acid sequence (从氨基酸顺序预言蛋白质结构). *Nature* 271:15—20.

Karplus, M., and Weaver, D. L., 1976. Protein-folding dynamics (蛋白质折叠动力学). *Nature* 260:404—406.

Levitt, M., and Chothia, C., 1976. Structural patterns in globular proteins (球形蛋白的结构型式). *Nature* 261:552—558.

Chothia, C., 1975. Structural invariants in protein folding (在蛋白质折叠中结构不变的因素). *Nature* 254:304—308.

Anfinsen, C. B., 1964. On the possibility of predicting tertiary structure from primary sequence (从一级结构预言三级结构的可能性). In Sela, M., (ed.), *New Perspectives in Biology* (生物学中的新透视法), pp. 42—50. American Elsevier.

### 评论文章

*Advances in Protein Chemistry.*

*Annual Review of Biochemistry.*

*Annual Review of Biophysics and Bioengineering.*

## 第 3 章

### 入门读物

Kendrew, J. C., 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule (蛋白质分子的三维结构). *Sci. Amer.* 205 (6):96—11. [也有 *Sci. Amer.* 单行本 121.]

Perutz, M. F., 1964. The hemoglobin molecule (血红蛋白分子). *Sci. Amer.* 211(5):64—76. [单行本 196.]

Kendrew, J. C., 1963. Myoglobin and the structure of proteins (肌红蛋白和蛋白质结构). *Science* 139:1259—1266.

## x 射线晶体学

Matthews, B. W., 1977. X-ray structure of proteins (蛋白质的 X 射线结构). In Neurath, H., and Hill, R. L., (eds.), *The Proteins* (蛋白质) (3rd ed.), vol. 3, pp. 404—590. Academic Press.

Holmes, K. C., and Blow, D. M., 1965. *The Use of X-ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure* (应用 X 光衍射研究蛋白质和核酸的结构). Wiley-Interscience. [对生物化学最重要的技术作了出色的介绍.]

Glusker, J. P., and Trueblood, K. N., 1972. *Crystal Structure Analysis: A Primer* (晶体结构分析: 入门读物). Oxford University Press. [一本简明易懂的 x 射线晶体学入门书.]

## 肌红蛋白和血红蛋白的结构

Watson, H. C., 1969. The stereochemistry of the protein myoglobin (蛋白质肌红蛋白的立体结构). *Prog. Stereochem.* 4:299—333. [详细介绍了抹香鲸高铁肌红蛋白的三维结构, 包括结构中所有非氢原子的原子坐标.]

Takano, T., 1977. Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution (分辨率为 2.0 Å 的肌红蛋白结构). *J. Mol. Biol.* 110:537—584. [抹香鲸高铁肌红蛋白和脱氧肌红蛋白的结构分析.]

Phillips, S. E. V., 1978. Structure of oxymyoglobin (氧合肌红蛋白的结构), *Nature* 273:247—248.

Steigemann, W., and Weber, E., 1979. Structure of erythrocyruorin in different ligand states refined at 1.4 Å resolution (分辨率在 1.4 Å 下精细分析处于不同配位状态的无脊椎红血蛋白的结构), *J. Mol. Biol.* 127: 309—338. [一种与肌红蛋白和血红蛋白类似的单聚昆虫血红蛋白的高分辨结构分析.]

Perutz, M. F., 1976. Structure and mechanism of heamoglobin (血红蛋白的结构与机理), *Brit. Med. Bull.* 32: 195—208.

## 肌红蛋白的重新折叠

Harrison, S. C., and Blout, E. R., 1965. Reversible conformational changes of myoglobin and apomyoglobin (肌红蛋白和脱辅基肌红蛋白的可逆构象变化), *J. Biol. Chem.* 240:299—303.

## 生理学方面

Wittenberg, J. B., 1970. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle (肌红蛋白促进的氧扩散: 氧进入肌肉时肌红蛋白的作用), *Physiol. Rev.* 50: 559—636.

Garby, L., and Meldon, J., 1977. *The Respiratory Functions of Blood* (血的呼吸功能). Plenum.

## 分子的进化

Zuckerkandl, E., 1965. The evolution of hemoglobin (血红蛋白的进化), *Sci. Amer.* 212(5):110—118. [单行本1012.]

Dayhoff, M. O., Hunt, L. T., McLaughlin, P. J., and Jones, D. D., 1972. Gene duplications in evolution: the globins (进化中的基因复制: 珠蛋白). In Dayhoff, M. O., (ed.), *Atlas of Protein Sequence and Structure* (蛋白质顺序和结构图谱集), vol. 5, pp. 17—30. National Biomedical

Research Foundation, Silver Springs, Maryland.

## 模型系统

Collman, J. P., 1977. Synthetic models for the oxygenbinding hemoproteins (结合氧的血红素蛋白的合成模型), *Acc. Chem. Res.* 10:265—272. [这是一篇关于围篱卟啉的信息丰富的评论.]

Collman, J. P., Brauman, J. I., Halbert, T. R., and Suslick, K. S., 1976. Nature of  $O_2$  and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins ( $O_2$ 和CO结合金属卟啉和血红素蛋白的性质), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73:3333—3337. [对肌红蛋白和血红蛋白降低一氧化碳结合量提出了结构的基础.]

Traylor, T. G., 1978. Hemoprotein oxygen transport: models and mechanisms (血红素蛋白的氧运输: 模型和机理). In Van Tamelen, E. E., (ed.), *Bioorganic Chemistry* (生物有机化学), vol. 4, pp. 437—468. Academic Press.

## 第 4 章

### 入门读物

Perutz, M. F., 1964. The hemoglobin molecule (血红蛋白分子), *Sci. Amer.* 211(11): 2—14. [对1964年前血红蛋白在x射线晶体学方面所作的努力作了引人入胜的说明, 也可见单行本196.]

Perutz, M. F., 1978. Hemoglobin structure and respiratory transport (血红蛋白结构和呼吸作用中的运输), *Sci. Amer.* 239(6):92—125. [在这篇优秀的文章中回顾了近十四年来血红蛋白方面的工作, 讨论了它变构性质的结构基础.]

### 综述和专著

Perutz, M. F., 1979. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron (血红蛋白氧亲和性的调节: 珠蛋白结构对血红素铁的影响), *Ann. Rev. Biochem.* 48:327—386.

Bauer, C., 1974. On the respiratory function of hemoglobin (血红蛋白在呼吸方面的功能), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70: 1—29.

Bunn, H. F., Forget, B. G., and Ranney, H. M., 1977. *Human Hemoglobins* (人血红蛋白). Saunders.

Garby, L., and Meldon, J., 1977. *The Respiratory Functions of Blood* (血的呼吸功能). Plenum.

Antonini, E., and Brunori, M., 1971. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands* (与配合体反应中的血红蛋白和肌红蛋白). North-Holland.

### 波尔效应和二磷酸甘油酸的作用

Kilmartin, J. V., and Rossi-Bernardi, L., 1973. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates (血红蛋白与氢离子、二氧化碳和有机磷酸盐的相互作用), *Physiol. Rev.* 53:836—890.

Kilmartin, J. V., 1976. Interaction of haemoglobin with protons,  $CO_2$ , and 2,3-diphosphoglycerate (血红蛋白与质子、 $CO_2$ 和2,3-二磷酸甘油酸的相互作用), *Brit. Med. Bull.* 32:209—222.

Benesch, R., and Benesch, R. E., 1969. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen

release by haemoglobin (细胞内的有机磷酸盐作血红蛋白释放氧的调节剂), *Nature* 221:618—622.

Lenfant, C., Torrance, J. D., Woodson, R. D., Jacobs, P., and Finch, C. A., 1970. Role of organic phosphates in the adaptation of man to hypoxia (有机磷酸盐在人适应缺氧过程中的作用), *Fed. Proc.* 29: 1115—1117.

Tyuma, I., and Shimizu, K., 1970. Effect of organic phosphates on the difference in oxygen affinity between fetal and adult human hemoglobin (有机磷酸盐对胎儿和成年人的血红蛋白在氧亲和性方面的差异所起的作用), *Fed. Proc.* 29: 1112—1114.

Morpurgo, G., Arese, P., Bosia, A., Pescarmona, G. P., Luzzana, M., Modiano, G., and Ranjet, S. K., 1976. Sherpas living permanently at high altitude: a new pattern of adaptation (永久住在高山上的 Sherpas 人: 一种新的适应样式), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73:747—751.

### 变构相互作用的机理

Perutz, M. F., 1970. Stereochemistry of cooperative effects of haemoglobin (血红蛋白协作效应的立体化学), *Nature* 228:726—739. [为血红蛋白变构性质的机理提出一个促进的假设.]

Hopfield, J. J., 1973. Relationship between structure, cooperativity, and spectra in a model of hemoglobin action (在血红蛋白作用的模型中结构、协作性和光谱间的关系), *J. Mol. Biol.* 77: 207—222.

Gelin, B. R., and Karplus, M., 1977. Mechanism of tertiary structural change in hemoglobin (在血红蛋白中三级结构变化的机制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 801—805.

Baldwin, J., and Chothia, C., 1979. Hemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism (血红蛋白: 与配位基结合有关的结构变化和它的变构机制), *J. Mol. Biol.* 129: 175—220.

## 第 5 章

### 入门读物

Allison, A. C., 1956. Sickle cells and evolution (镰刀形细胞和进化), *Sci. Amer.* 195(2): 87—94. [单行本 1065.]

Perutz, M. F., and Lehmann, H., 1968. Molecular pathology of human haemoglobin (人血红蛋白的分子病理学), *Nature* 219:902—909. [对五十多种突变体血红蛋白进行了里程碑的分析。将临床症状与推测的结构改变联系起来.]

### 镰刀形细胞贫血

Dean, J., and Schechter, A. N., 1978. Sickle-cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches (镰刀形细胞贫血: 治疗途径的分子和细胞基础), *New Engl. J. Med.* 299: 752—763, 804—811, and 863—870. [镰刀形细胞贫血的结构、遗传和临床方面的一个出色的评论.]

Herrick, J. B., 1910. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia (严重贫血病例中所见细长和镰刀形的红血球), *Arch. Intern. Med.* 6:517—521.

Neel, J. V., 1949. The inheritance of sickle-cell anemia (镰刀形细胞贫血病的遗传), *Science* 110:64—66.

Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., and Wells, I. C., 1949. Sickle cell anemia: a molecular disease (镰刀形细胞贫血: 一种分子病), *Science* 110:543—548.

Ingram, V. M., 1957. Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between



normal and sickle cell haemoglobin (人血红蛋白的基因突变: 正常的和镰刀形细胞血红蛋白间的化学差异), *Nature* 180:326—328.

Pasvol, G., Weatherall, D. J., and Wilson, R. J. M., 1978. Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria (血红蛋白 S 对抗 *P. falciparum* 疟疾保护作用的细胞机制), *Nature* 274: 701—703.

Behe, M. J., and Englander, S. W., 1978. Sickle hemoglobin gelation: reaction order and critical nucleus size (镰刀形血红蛋白的凝结: 反应级数和临界核大小), *Biophys. J.* 23:129—145.

Eaton, W. A., Hofrichter, J., and Ross, P. D., 1976. Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease (凝结延迟时间: 镰刀形细胞病临床严重性的一个可能的决定因素), *Blood* 47: 621—627.

### 其他突变种血红蛋白

Bunn, H. F., Forget, B. G., and Ranney, H. M., 1977. *Human Hemoglobins* (人的血红蛋白). Saunders.

Caughey, W. S., (ed.), 1978. *Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities* (血红蛋白异常性的生物化学和临床方面), Academic Press.

Lehmann, H., and Huntsman, R. G., 1974, *Man's Haemoglobins* (人的血红蛋白) (2nd ed.), Lippincott.

Winslow, R. M., and Anderson, W. F., 1978. The hemoglobinopathies (血红蛋白病). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (遗传病的代谢基础) (4th ed.), pp. 1465—1507. McGraw-Hill.

Bellingham, A. J., 1976. Hemoglobins with altered oxygen affinity (改变了氧亲和性的血红蛋白), *Brit. Med. Bull.* 32:234—238.

### 疾病和进化

Zuckerhandl, E., and Pauling, L., 1962. Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity (分子病、进化和基因变异性), In Kasha, M., and Pullman, B., (eds.), *Horizons in Biochemistry* (生物化学的前景), pp. 189—225. Academic Press.

Cavalli-Sforza, L. L., and Bodmer, W. F., 1971. *The Genetics of Human Populations* (人类种群遗传学). Freeman. [第四和第五章对遗传的多形性作了十分出色的讨论.]

## 第 6 章

### 入门读物

Koshland, D. E., Jr., 1973. Protein shape and biological control (蛋白质形状和生物控制). *Sci. Amer.* 229(4): 52—64. [十分出色地介绍了构象的可变性对于酶的作用的专一性和调节的重要性。可见单行本1280.]

### 关于酶的专著

Fersht, A., 1977. *Enzyme Structure and Mechanism* (酶的结构和机理). Freeman. [一本简明的关于酶作用的入门书, 它强调了物理原理.]

Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms* (酶的反应机理). Freeman. [出色地说明了酶作用的化学基础。作者证明生物体系中大量的酶催化反应可以归并为少量的化学反应类型。]

Boyer, P. D., (ed.), 1970. *The Enzymes* (酶) (3rd ed.). Academic Press. [这一套多卷的关于酶的论文集, 包含了丰富的资料, 卷一和二 (可以得到平装的版本) 研究了酶结构、机制和调节的总的方面。卷三和其后各卷包含了关于单个酶的详尽而权威的论文。]

### 酶动力学和机理

Fersht, A. R., 1974. Catalysis, binding, and enzyme-substrate complementarity (催化、结合和酶-底物互补性), *Proc. Roy. Soc.* B187:397—407.

Jencks, W. P., 1975. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect (结合能、专一性和酶催化: Circe 效应), *Advan. Enzymol.* 43: 219—410.

Knowles, J. R., and Albery, W. J., 1976. Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency (酶功能的进化和催化效率的发展), *Biochemistry* 15: 5631—5640.

Warshel, A., 1978. Energetics of enzyme catalysis (酶催化的能力学), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75: 5250—5254. [提出了强调静电相互作用重要性的假设。]

### 变构相互作用

Monod, J., Changeux, J.-P., and Jacob, F., 1963. Allosteric proteins and cellular control systems (变构蛋白和细胞控制系统), *J. Mol. Biol.* 6:306—329. [一篇引入变构相互作用概念的经典论文。]

Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P., 1965. On the nature of allosteric transitions (关于变构转换的性质), *J. Mol. Biol.* 12:88—118. [提出了关于变构转换的协调模型。]

Koshland, D. E., Jr., Nemethy, G., and Filmer, D., 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits (含有亚基的蛋白质的实验的结合数据和理论模型的比较), *Biochemistry* 5:365—385. [提出了变构转换的循序模型。]

### 分子相互作用和结合

Richards, F. M., Wyckoff, H. W., and Allewell, N., 1970. The origin of specificity in binding: a detailed example in a protein-nucleic acid interaction (结合专一性的来源: 蛋白-核酸相互作用的一个详细的例子). In Schmitt, F. O., (ed.), *The Neurosciences: Second Study Program* (神经科学: 第二研究程序), pp. 901—912. Rockefeller University Press.

Davidson, N., 1967. Weak interactions and the structure of biological macromolecules (弱相互作用和生物大分子结构). In Quarton, G. C., Melnechuk, T., and Schmitt, F. O., (eds.), *The Neurosciences: A Study Program* (神经科学: 一种研究程序), pp. 46—56. Rockefeller University Press.

Tanford, C., 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter (疏水作用和生命物质的组织), *Science* 200: 1012—1018.

## 第 7 章

### 入门读物

Phillips, D. C., 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule (一个酶分子的三维结构), *Sci. Amer.* 215(5):78—90. [一篇极为出色的关于溶菌酶三维结构和催化机制的文章, 可见单行本1055。]

Lipscomb, W. N., 1971. Structures and mechanisms of enzymes (酶的结构和机制), *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* 15:131—156. [对于羧肽酶A和几种别的酶的结构与机制作了。

精采的叙述和透彻的讨论.]

### 溶菌酶的结构和酶的作用机制

Osserman, E. F., Canfield, R. E., and Beychok, S., (eds.), 1974. *Lysozyme*. Academic Press.  
Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. C. T., Phillips, D. C., and Rupley, J. A., 1972. Vertebrate lysozymes (脊椎动物溶菌酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 7, pp. 666—868. Academic Press.

Dahlquist, F. W., Rand-Meir, T., and Raftery, M. A., 1968. Demonstration of carbonium ion intermediate during lysozyme catalysis(溶菌酶催化时正碳离子中间体存在的证明), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61:1194—1198.

Rupley, J. A., 1967. The binding and cleavage by lysozyme of *N*-acetylglucosamine oligosaccharides (*N*-乙酰葡萄糖胺寡糖被溶菌酶结合并裂解), *Proc. Roy. Soc. (B)*167: 416—428. [介绍在 $^{18}\text{O}$  水中水解的产物, 结合寡糖的  $G^+$  和溶菌酶水解的速度.]

Ford, L. O., Johnson, L. N., Mackin, P. A., Phillips, D. C., and Tjian, R., 1974. Crystal structure of a lysozyme-tetrasaccharide lactone complex (一种溶菌酶-四聚糖内酯复合体的晶体结构), *J. Mol. Biol.* 88: 349—371.

### 催化作用中应变的作用

Pauling, L., 1948. Nature of forces between large molecules of biological interest (生物学关注的大分子间力的性质), *Nature* 161: 707—709. [包括一个关于酶催化中应变重要性的富有想象力的说明.]

Wolfenden, R., 1972. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions (模拟法求解酶反应中过渡态的结构), *Acc. Chem. Res.* 5:10—18.

Leinhardt, G. E., 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory (酶催化和过渡态理论), *Science* 180: 149—154.

Secemski, I. I., and Lienhardt, G. E., 1971. The role of strain in catalysis by lysozyme (溶菌酶催化中应变的作用), *J. Amer. Chem. Soc.* 93:3549—3550.

Schindler, M., and Sharon, N., 1976. A transition state analog of lysozyme catalysis prepared from the bacterial cell wall tetrasaccharide (用细胞壁四聚糖制备溶菌酶催化的过渡态类似物), *J. Biol. Chem.* 251:4330—4335.

Warshel, A., and Levitt, M., 1976. Theoretical studies of enzymatic reactions: dielectric, electrostatic, and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme (酶反应的理论研究: 在溶菌酶作用中正碳离子的介电、静电和空间稳定作用), *J. Mol. Biol.* 103:227—249. [这些计算表明, 对于促进溶菌酶生成正碳离子, 静电因素比空间因素更重要.]

### 羧肽酶 A 的结构和酶的作用机制

Quijcho, F. A., and Lipscomb, W. N., 1971. Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme (羧肽酶 A: 一种蛋白质和一种酶), *Advan. Protein Chem.* 25: 1—78. [对这种酶的结晶学研究的评论, 包括原子坐标.]

Makinen, M. W., Yamamura, K., and Kaiser, E. T., 1976. Mechanism of action of carboxypeptidase in ester hydrolysis(羧肽酶在酯水解中的作用机制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 3882—3886. [提供了酯底物水解中一个共价酰基-酶中间体的证据.]

Breslow, R., and Wernick, D. L., 1977. Unified picture of mechanisms of catalysis by carbo-

xypeptidase A (羧肽酶 A 催化机制的统一图象), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 1303—1307. [提供了肽底物直接水解的证据, 并提出酯和肽水解的机制不同.]

## 第 8 章

### 入门读物

Stroud, R. M., 1974. A family of protein-cutting proteins (切除蛋白质的蛋白质家族), *Sci. Amer.* 231(1): 24—88. [一篇介绍丝氨酸蛋白酶的结构、催化性质和进化的优秀的文章. 可见单行本1301.]

McKusick, V. A., 1965. The royal hemophilia (皇族血友病), *Sci. Amer.* 213(2): 88—95.

### 丝氨酸蛋白酶及其酶原

Blow, D. M., 1976. Structure and mechanism of chymotrypsin (糜蛋白酶的结构和机制), *Acc. Chem. Res.* 9:145—152.

Huber, R., and Bode, W., 1978. Structural basis of the activation and action of trypsin (胰蛋白酶的活化和作用的结构基础), *Acc. Chem. Res.* 11:114—122.

Kraut, J., 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis (丝氨酸蛋白酶: 结构和催化的机制), *Ann. Rev. Biochem.* 46: 331—358.

Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A., and Chambers, J. L., 1977. Mechanisms of zymogen activation (酶原活化的机制), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6: 177—193.

Boyer, P. D., (ed.), 1971. *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 3. Academic Press. [这一卷包括许多关于蛋白水解酶、酶原和抑制剂的优秀论文.]

### 酸性蛋白酶及其酶原

Tang, J., 1976. Pepsin and pepsinogen: models for carboxyl (acid) proteases and their zymogens [胃蛋白酶和胃蛋白酶原: 羧基(酸性)蛋白酶和其酶原的模型], *Trends Biochem. Sci.* 1:205—208.

### 胰蛋白酶抑制剂

Laskowski, M., Jr., and Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases (蛋白酶的蛋白质抑制剂), *Ann. Rev. Biochem.* 49:593—626.

Ruhlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., and Huber, R., 1973. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor (由牛胰蛋白酶和牛胰的胰蛋白酶抑制剂生成的复合体的结构), *J. Mol. Biol.* 89: 73—101.

Sweet, R. M., Wright, H. T., Janin, J., Chothia, C. H., and Blow, D. M., 1974. Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6 Å resolution [猪胰蛋白酶与大豆胰蛋白酶抑制剂(即 Kunitz 抑制剂)的分辨率在 2.6 Å 的晶体结构], *Biochemistry* 13:4212—4228.

### 生物过程中的蛋白酶

Reich, E., Rifkin, D. B., and Shaw, E., (eds.), 1975. *Proteases and Biological Control*. Cold Spring Harbor Laboratory. [很好地收集了范围很广的生物学过程中蛋白酶作用的论文, 例如受精、细胞迁移、肿瘤的侵入力、形态发生和变态作用.]

Fong, D., and Bonner, J. T., 1979. Proteases in cellular slime mold development: evidence for their involvement (细胞粘菌发育中的蛋白酶: 它们被涉及的证据), *Proc. Nat. Acad. Sci.*

## 血液凝块

Jackson, C. M., and Nemerson, Y., 1980. Blood coagulation (血液凝固), *Ann. Rev. Biochem.* 49:765—811.

Ratnoff, O. D., 1978. Hereditary disorders of hemostasis (止血的遗传性障碍) In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1755—1791. McGraw-Hill.

Davie, E. W., and Hanahan, D. J., 1977. Blood coagulation proteins (血液凝结蛋白). In Putnam, F. W., (ed.), *The Plasma Proteins* (2nd ed.), pp. 422—544. Academic Press.

Ogston, D., and Bennett, B., (eds.), 1977. *Haemostasis: Biochemistry, Physiology, and Pathology*. Wiley.

Stenflo, J., and Suttie, J. W., 1977. Vitamin K-dependent formation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid ( $\gamma$ -羧基谷氨酸的生成与维生素 K 的相依性), *Ann. Rev. Biochem.* 46:157—172.

Link, K. P., 1943. The anticoagulant from spoiled sweet clover hay (来自腐败的甜三叶草干草的抗凝血剂), *Harvey Lectures* 39: 162—216. [引人入胜地说明了双羟香豆素和它的抗凝血作用的发现.]

Doolittle, R. F., 1973. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion (从结构来看血纤维蛋白原到血纤维蛋白的转化), *Advan. Protein Chem.* 27: 1—109.

Tooney, N. M., and Cohen, C., 1977. Crystalline states of a modified fibrinogen (修饰的纤维蛋白原的结晶状态), *J. Mol. Biol.* 110:363—385.

Massie, R. K., 1967. *Nicholas and Alexandra. Dell*. [对血友病和俄国历史相互关系的生动的说明.]

## 第 9 章

### 入门读物

Eyre, D. R., 1980. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold (胶原: 身体蛋白骨架中的分子多样性), *Science* 207:1315—1322.

Bornstein, P., and Traub, W., 1979. The chemistry and biology of collagen (胶原的化学和生物学). In Neurath, H., and Hill, R. L., (eds.), *The Proteins* (3rd ed.), vol. 4, pp. 411—632. Academic Press.

Gross, J., 1973. Collagen biology: structure, degradation, and disease (胶原生物学: 结构、降解和疾病). *Harvey Lectures* 68:351—432.

Ross, R., and Bornstein, P., 1971. Elastic fibers in the body (身体中的弹性纤维), *Sci. Amer.* 224(6):44—52. [可见 *Sci. Amer.* 单行本1225.]

### 专著

Ramachandran, G. N., and Reddi, A. H., (eds.), 1976. *Biochemistry of Collagen*. Plenum.

Burleigh, P. M. C., and Poole, A. R., (eds.), 1975. *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*. American Elsevier.

## 胶原的生物合成

Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L., and Guzman, N. A., 1979. The biosynthesis of collagen and its disorders (胶原的生物合成和它的紊乱). *New Engl. J. Med.* 301:13—23 and 77—85.

Fessler, J. H., and Fessler, L. I., 1978. Biosynthesis of collagen (胶原的生物合成). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 129—162.

Jackson, D. S., 1978. Biosynthesis of collagen (胶原的生物合成). In Arnstein, H. R. V., (ed.), *Amino Acid and Protein Biosynthesis II* (氨基酸和蛋白质的生物合成 II), International Review of Biochemistry, vol. 18, pp. 233—259. University Park Press.

Fessler, L. I., Morris, N. P., and Fessler, J. H., 1975. Procollagen: biological scission of amino and carboxyl extension peptides. (溶胶原: 氨基和羧基延伸肽的生物割裂), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:4905—4909.

Bruns, R. R., Hulmes, D. J. S., Therrien, S. F., and Gross, J., 1979. Procollagen segment-long-spacing crystallites: their role in collagen fibrillogenesis (溶胶原长间隔片段微晶: 它们在胶原纤维生成中的作用). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:313—317.

Tanzer, M. L., 1973. Cross-linking of collagen (胶原的交联). *Science* 180:561—566.

## 胶原的羟化作用

Cardinale, G. J., and Udenfriend, S., 1974. Prolyl hydroxylase (脯氨酰羟化酶), *Advan. Enzymol.* 41: 245—300.

Hayaishi, O., (ed.), 1974. *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Academic Press.

Berg, R. A., and Prockop, D. J., 1973. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen: evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen (胶原非羟化形式的热转化: 羟基脯氨酸在稳定胶原三重螺旋中起作用的证据). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52: 115—120.

## 胶原酶

Gross, J., and Nagai, Y., 1965. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme (蝌蚪胶原降解酶对胶原分子的专一降解). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54: 1197—1204.

Seifter, S., and Harper, E., 1971. The collagenases (胶原酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 3, pp. 649—697. Academic Press.

## 弹性蛋白

Sandberg, L. B., 1976. Elastin structure in health and disease (在健康和疾病个体中的弹性蛋白结构). *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 7: 159—210.

Urry, D. W., 1974. On the molecular basis for vascular calcification (血管钙化的分子基础). *Perspect. Biol. Med.* 18:68—84. [讨论了钙离子与弹性蛋白的结合.]

## 氨基葡萄糖

Lindahl, U., and Höök, M., 1978. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules (氨基多糖及其与生物大分子的结合). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 385—417.

## 结缔组织疾病

Pinnell, S. R., 1978. Disorders of collagen (胶原的紊乱). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1366—1394. McGraw-Hill.

Trelstad, R. L., Rubin, D., and Gross, J., 1977. Osteogenesis imperfecta congenita: evidence for a generalized molecular disorder of collagen (有先天性缺陷的骨的生成: 普遍性的胶原分子无序的证据). *Lab. Invest.* 36:501—508.

Krane, S. M., Pinnell, S. R., and Erbe, R. W., 1972. Lysyl-protocollagen hydroxylase deficiency in fibroblasts from siblings with hydroxylysine-deficient collagen (来自缺失羟基赖氨酸胶原的姐妹体的成纤维细胞中的赖氨酸-溶胶原羟化酶缺乏症). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69: 2899—2903.

Lapiere, C. M., Lenaers, A., and Kohn, L. D., 1971. Procollagen peptidase: an enzyme excising the coordination peptides of procollagen (溶胶原肽酶: 一个切除溶胶原配位肽的酶). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:3054—3058. [一种牲畜的遗传性结缔组织障碍(真皮脆弱病)中分子缺陷的证实.]

Major, R. H., (ed.), 1945. *Classic Descriptions of Disease* (3rd. ed.). Thomas. [坏血病的 Cartier 描述见本卷 p.587.]

Nishikimi, M., and Udenfriend, S., 1977. Scurvy as an inborn error of ascorbic acid biosynthesis (坏血病是一种抗坏血酸生物合成的先天障碍). *Trends Biochem. Sci.* 2:111—112.

## 第 10 章

### 入门读物

Singer, S. J., and Nicolson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes (细胞膜结构的流动镶嵌模型). *Science* 175:720—731.

Raff, M. C., 1976. Cell-surface immunology (细胞表面免疫学). *Sci. Amer.* 234(5): 30—39. [本文清晰易懂, 说明了抗体对我们认识细胞表面结构和动力学所起的作用. 可见 *Sci. Amer.* 单行本 1338.]

Rothman, J. E., and Lenard, J., 1977. Membrane asymmetry (膜不对称性). *Science* 195: 743—753.

### 专著和综述

Bretscher, M. S., and Raff, M. C., 1975. Mammalian plasma membranes (哺乳动物质膜). *Nature* 258:43—49.

Bretscher, M. S., 1973. Membrane structure: some general principles (膜结构: 某些一般原理). *Science* 181:622—629.

Ashwell, G., and Morell, A. G., 1977. Membrane glycoproteins and recognition phenomena (膜糖蛋白和识别现象). *Trends Biochem. Sci.* 2:76—78.

Tyrrrell, D. A., Heath, T. D., Colley, C. M., and Ryman, B. E., 1976. New aspects of liposomes (脂质体的新情况). *Biochim. Biophys. Acta* 457:259—302.

Poste, G., and Nicolson, G. L., (eds.), 1977. *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization*. North-Holland. [包含膜动力学、细胞-表面免疫学和细胞生长及恶性转化时细胞表面蛋白质的变化的论文.]

Tanford, C., 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd ed. Wiley-Interscience. [从热力学方面清晰地阐述了膜的结构.]

### 膜动力学

Frye, C. D., and Edidin, M., 1970. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons (小鼠-人异核体生成后细胞表面抗原的快速混合). *J. Cell Sci.* 7: 319—335.

Kornberg, R. D., and McConnell, H. M., 1971. Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes (在泡膜中磷脂的内外侧转移). *Biochemistry* 10: 1111—1120.

Cone, R. A., 1972. Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane (视紫红质在视受体膜中的旋转扩散). *Nature New Biol.* 236:39—43.

Poo, M., and Cone, R. A., 1974. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane (视紫红质在光受体膜中的侧向扩散). *Nature.* 247:438—441.

Elson, E. L., and Schlessinger, J., 1979. Long-range motions on cell surfaces (细胞表面的长程移动). In Schmitt, F. O., and Worden, F. G., (eds.), *The Neurosciences: Fourth Study Program*, pp. 691—701. MIT Press [讨论了荧光光致脱色复原技术和它在测定细胞表面组成的侧向扩散中的应用.]

Seelig, A., and Seelig, J., 1977. Effect of a single *cis* double bond on the structure of a phospholipid bilayer (单一顺式双键对磷脂双层结构的作用). *Biochemistry* 16:45—50.

### 膜的电学显微术

Branton, D., 1966. Fracture faces of frozen membranes (冰冻膜的断裂面). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55:1048—1056.

Henderson, R., and Unwin, P. N. T., 1975. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy (由电子显微术得到的紫膜三维模型). *Nature* 257:28—32. [膜蛋白的第一张图, 用7 Å 的分辨率证实了横跨膜螺旋.]

Unwin, P. N. T., and Henderson, R., 1975. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens (用洁净晶体样品的电子显微术测定分子结构). *J. Mol. Biol.* 94:425—440. [介绍了形成高度有序二维点阵膜蛋白的结构的测定实验概要.]

### 红细胞膜

Steck, T. L., 1974. The organization of proteins in the human red blood cell membrane (人的红血细胞膜中蛋白质的组织). *J. Cell Biol.* 62:1—19.

Marchesi, V. T., Furthmayr, H., and Tomita, M., 1976. The red cell membrane (红细胞膜). *Ann. Rev. Biochem.* 45:667—698.

Steck, T. L., 1978. The band 3 protein of the human red cell membrane: a review (人红细胞的带-3蛋白: 评论). *J. Supramol. Struct.* 8:311—324.

### 合成和重建膜

Fleischer, S., and Packer, L., (eds.), 1974. *Methods in Enzymology*, vol. 32. Academic Press. [包含了有关膜研究的实验方法的优秀论文, 包括制作模型膜和重构膜的实验步骤.]

Darszon, A., Vandenberg, E. A., Ellisman, M. H., and Montal, M., 1979. Incorporation of membrane proteins into large single bilayer vesicles (膜蛋白掺入到大的单一双层泡中). *J. Cell*



Biol. 81:446—452.

Racker, E., 1977. Perspectives and limitations of resolutions-reconstitution experiments (分解-重构实验的前景和限制). *J. Supramol. Struct.* 6:215—228.

## 第 11 章

### 代谢概论

Krebs, H. A., and Kornberg, H. L., 1957. *Energy Transformations in Living Matter*. Springer-Verlag. [包括一有价值的附录, 由 K. Burton 编写, 有热力学数据.]

Wood, W. B., 1974. *The Molecular Basis of Metabolism*. Unit 3 in Biocore. McGraw-Hill.

### 热力学

Klotz, I. M., 1967. *Energy Changes in Biochemical Reactions*. Academic Press. [简明引论, 极为精辟.]

Bray, H. G., and White, K., 1966. *Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry* (2nd ed.). Academic Press.

Hill, T. L., 1977. *Free Energy Transduction in Biology*. Academic Press.

Ingraham, L. L., and Pardee, A. B., 1967. Free energy and entropy in metabolism (代谢中的自由能和熵). In Greenberg, D. M., (ed.), *Metabolic Pathways* (3rd ed.), vol. 1, pp. 1—46. Academic Press.

Alberty, R. A., 1968. Effect of pH and metal ion concentration on the equilibrium hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate (pH 和金属离子浓度对腺三磷-腺二磷水解平衡的影响), *J. Biol. Chem.* 243:1337—1343.

Jencks, W. P., 1970. Free energies of hydrolysis and decarboxylation (水解反应和脱羧反应的自由能). In Sober, H. A., *Handbook of Biochemistry* (2nd ed.), pp. J181—J186. Chemical Rubber Co.

### 代谢的调节

Newsholme, E. A., and Start, C., 1973. *Regulation in Metabolism*. Wiley. [哺乳动物代谢调节的精采论述.]

Atkinson, D. E., 1977. *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. Academic Press. [有关于能荷和代谢控制其他方面概念的详细论述.]

Erecińska, M., and Wilson, D. F., 1978. Homeostatic regulation of cellular energy metabolism (细胞中能量代谢的稳态调节), *Trends Biochem. Sci.* 3:219—223. [线粒体中磷酸化潜势的调节作用的综述.]

### 历史概况

Kalckar, H. M., (ed.), 1969. *Biological Phosphorylations*. Prentice-Hall. [收集了关于生物力能学方面许多经典论文, 很有价值.]

Fruton, J. S., 1972. *Molecules and Life*. Wiley-Interscience. [1800 年以来关于化学和生物学相互影响方面有远见卓识和博学的论文, 代谢和生物力能学也在详细讨论的题目之中.]

Lipmann, F., 1971. *Wanderings of a Biochemist*. Wiley-Interscience. [包括作者的某些经典论文和引人入胜的作品的抽印本.]

## 第 12 章

### 专著和一般综述

Davison, E. A., 1967. *Carbohydrate Chemistry*. Holt, Rinehart, and Winston.

Pigman, W. W., and Horton, D., (eds.), 1972. *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*. Academic Press.

Dickens, F., Randle, P. J., and Whelan, W. J., 1968. *Carbohydrate Metabolism and Its Disorders*, vols. 1 and 2. Academic Press.

### 糖酵解的酶

Boyer, P. D., (ed.), 1972. *The Enzymes* (3rd ed.), Academic Press. [卷五到卷九有关于每一种糖酵解酶的权威性评述。乙醇脱氢酶和乳酸脱氢酶在第十卷中讨论.]

Blake, C. C. F., 1975. X-ray studies of glycolytic enzymes (糖酵解酶的x射线研究), *Essays Biochem.* 11:37—79.

Bennett, W. S., Jr., and Steitz, T. A., 1978. Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase (葡萄糖诱导的酵母己糖激酶在构象上的变化), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:4848—4852.

Knowles, J. R., and Albery, W. J., 1977. Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase (酶催化作用是完美无缺的: 三碳糖磷酸异构化酶的力能学), *Acc. Chem. Res.* 10:105—111.

Biesecker, G., Harris, J. I., Thierry, J. C., Walker, J. E., and Wonacott, A. J., 1977. Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* (从 *Bacillus stearothermophilus* 提取的D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶的氨基酸顺序和结构), *Nature* 266: 328—333.

Anderson, C. M., Zucker, F. H., and Steitz, T. A., 1979. Space-filling models of kinase clefts and conformation changes (激酶裂隙的空间填充模型和构象变化), *Science* 204:375—380. [系图文并茂的作品, 说明激酶通常有一深裂缝, 与底物结合时此裂缝关闭.]

### 糖酵解的调节

Newsholme, E. A., and Start, C., 1973. *Regulation in Metabolism*. Wiley. [第三章和第六章系有关糖类代谢控制的精辟论述.]

Ottaway, J. H., and Mowbray, J., 1977. The role of compartmentation in the control of glycolysis (区域化在控制糖酵解中的作用), *Curr. Top. Cell Regul.* 12: 108—195.

Clark, M. G., and Lardy, H. A., 1975. Regulation of intermediary carbohydrate metabolism (中间糖代谢的调节), *Intern. Rev. Sci. (Biochem.)* 5:223—266.

### 分子进化

Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C. -I., and Banaszak, L. J., 1975. Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases (脱氢酶类之间在进化和结构上的相互关系), In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 11, pp. 61—102.

Levine, M., Muirhead, H., Stammers, D. K., and Stuart, D. I., 1978. Structure of pyruvate kinase and similarities with other enzymes: possible implications for protein taxonomy and evolution (丙酮酸激酶的结构及其与其他酶的相似性; 对于蛋白质分类和进化可能有启发), *Nature* 271:626—630.

## 2, 3-二磷酸甘油酸

Benesch, R. E., and Benesch, R., 1970. The reaction between diphosphoglycerate and hemoglobin (二磷酸甘油酸和血红蛋白之间的反应), *Fed. Proc.* 29:1101—1104.

Rose, Z. B., 1970. Enzymes controlling 2, 3-diphosphoglycerate in human erythrocytes (人的红细胞中控制 2, 3-二磷酸甘油酸的酶), *Fed. Proc.* 29: 1105—1111.

Dglivoria-Papadopoulos, M., Oski, F. A., and Gottlieb, A. J., 1969. Oxygen-hemoglobin dissociation curves: effect of inherited enzyme defects of the red cell (氧-血红蛋白解离曲线: 红细胞中遗传性酶缺失的影响), *Science* 165:601—602.

## 历史概况

Kalckar, H. M., (ed.), 1969. *Biological Phosphorylations: Development of Concepts*. Prentice-Hall. [有许多关于糖酵解的经典论文.]

Fruton, J. S., 1972. *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*. Wiley-Interscience. [有关于发酵本质的阐明以及它如何发展出酶化学的详细纪实的论述.]

## 第 13 章

### 专著和一般综述

Lowenstein, J. M., (ed.), 1969. *Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation*. Marcel Dekker.

Goodwin, T. W., (ed.), 1968. *The Metabolic Roles of Citrate*. Academic Press.

Lowenstein, J. M., 1971. The pyruvate dehydrogenase complex and the citric acid cycle (丙酮酸脱氢酶复合物与柠檬酸循环), *Compr. Biochem.* 18S:1—55.

### 反应机理和立体异构的专一性

Popják, G., 1970. Stereospecificity of enzymic reactions (酶促反应的立体异构专一性). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 2, pp. 115—215. Academic Press. [卓越的评述论文, 有关于柠檬酸循环的立体化学的讨论.]

Ogston, A. G., 1948. Interpretation of experiments on metabolic processes using isotopic tracer elements (解释利用同位素示踪元素所进行的有关代谢过程的实验), *Nature* 162:963.

Hirschmann, H., 1960. The nature of substrate asymmetry in stereoselective reactions (在立体异构上有选择性的反应中底物不对称性的本质), *J. Biol. Chem.* 235:2762—2767.

Bentley, R., 1969. *Molecular Asymmetry in Biology*, vols. 1 and 2. Academic Press. [这两册中有大量关于生物化学反应中立体结构专一性的资料。第一卷第二章讨论命名法, 第四章讨论前手性.]

### 氟柠檬酸和乌头酸酶

Peters, R., 1954. Biochemical light upon an ancient poison: a lethal synthesis (对于一种古老毒药的生物化学解释: 一种致命的合成反应), *Endeavor* 13:147—154. [讨论氟乙酸转变为氟柠檬酸——乌头酸酶的抑制剂.]

Gribble, G. W., 1973. Fluoroacetate toxicity (氟乙酸的毒性), *J. Chem. Ed.* 50:460—462.

Glusker, J. P., 1971. Aconitase (乌头酸酶), In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.),

### 丙酮酸和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物

Reed, L. J., 1974. Multienzyme complexes (多酶复合物), *Acc. Chem. Res.* 7:40—46.

Bates, D. L., Danson, M. J., Hale, G., Hooper, E. A., and Perham, R. N., 1977. Self-assembly and catalytic activity of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli* (大肠杆菌的丙酮酸脱氢酶多酶复合物的自动组装和催化活性), *Nature* 268:313—316.

Collins, J. H., and Reed, L. J., 1977. Acyl group and electron pair relay system: a network of interacting lipoyl moieties in the pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes from *Escherichia coli* (酰基和电子对的中继系统: 大肠杆菌的丙酮酸和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物中相互作用的双硫辛酸部分所组成的相互关连的体系), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:4223—4227.

Gutowski, J. A., and Lienhard, G. E., 1976. Transition state analogs for thiamine pyrophosphate-dependent enzymes (依赖于硫胺素焦磷酸的酶所具有的过渡状态类似物), *J. Biol. Chem.* 251: 2863—2866.

Randle, P. J., 1978. Pyruvate dehydrogenase complex: meticulous regulator of glucose disposal in animals (丙酮酸脱氢酶复合物: 动物体内葡萄糖贮藏方面精细的调节者), *Trends Biochem. Sci.* 3:217—219.

DeRosier, D. J., and Oliver, R. M., 1971. A low resolution electron density map of lipoyl transsuccinylase, the core of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex ( $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物的核心——硫辛酰琥珀酰转移酶的低分辨率的电子密度图), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 36:199—203.

### 柠檬酸循环的发现

Krebs, H. A., and Johnson, W. A., 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues (动物组织中的柠檬酸在中间代谢中的作用), *Enzymologia* 4:148—156.

Krebs, H. A., 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle (三羧酸循环的历史), *Perspect. Biol. Med.* 14:154—170.

## 第 14 章

### 入门读物

Hinkle, P. C., and McCarty, R. E., 1978. How cells make ATP (细胞是怎样制造 ATP 的), *Sci. Amer.* 238(3):104—123. [也见 *Sci. Amer.* 单行本 1383.]

Mitchell, P., 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences (凯林关于呼吸链的概念和化学渗透假说), *Science* 206:1148—1159. [米切尔在这篇诺贝尔讲演中总结了化学渗透概念的演变.]

Stoeckenius, W., 1976. The purple membrane of salt-loving bacteria (嗜盐菌的紫膜), *Sci. Amer.* 234(6):38—46. [单行本 1340.]

Dickerson, R. E., 1972. The structure and history of an ancient protein (一种古老蛋白的结构和历史), *Sci. Amer.* 226(4):58—72. [关于细胞色素 *c* 的构象和进化的文章, 附有精美插图. 单行本 1245.]

Dickerson, R. E., 1980. Cytochrome *c* and the evolution of energy metabolism (细胞色素 *c* 和能量代谢的进化), *Sci. Amer.* 242(3): 137—153.

## 专著

- Racker, E., 1976. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. Academic Press. [关于电子传递和磷酸化的生动的、独具风格的论述.]
- Quagliariello, E., Papa, S., Palmieri, F., Slater, E. C., and Siliprandi, N., (eds.), 1975. *Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation*. Academic Press.
- Lovenberg, W., (ed.), 1977. *Iron-Sulfur proteins*, vol. 3. Academic Press.

## 综述

- Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., and Slater, E. C., 1977. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation (氧化磷酸化和光合磷酸化), *Ann. Rev. Biochem.* 46:955—1026. [本领域中领先的研究工作者所写的一系列综述, 最好从 Ernster 的文章开始读.]
- Fillingame, R., 1980. The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation (氧化磷酸化的质子转运泵), *Ann. Rev. Biochem.* 49:1079—1114.
- Downie, J. A., Gibson, F., and Cox, G. B., 1979. Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells (原核细胞中膜上的腺三磷酸酶), *Ann. Rev. Biochem.* 48:103—131.
- DePierre, J. W., and Ernster, L., 1977. Enzyme topology of intracellular membranes (细胞内膜酶的空间排布), *Ann. Rev. Biochem.* 6:201—262. [关于线粒体内膜的呼吸链、ATP 酶和其他蛋白在膜上哪一侧的综述.]
- Salemme, F. R., 1977. Structure and function of cytochromes *c*. (细胞色素 *c* 的结构和功能), *Ann. Rev. Biochem.* 46:299—329.
- Beinert, H., 1977. Iron-sulfur centers of the mitochondrial electron transfer system (线粒体中电子传递系统内的铁硫中心). In Lovenberg, W., (ed.), *Iron-sulfur proteins*. vol. 3, pp. 61—100. Academic Press.
- Sweeney, W. V., and Rabinowitz, J. C., 1980. Proteins containing 4Fe-4S clusters: an overview (含 4Fe-4S 簇的蛋白质概述), *Ann. Rev. Biochem.* 49:139—161.
- Crane, F. L., 1977. Hydroquinone dehydrogenases. (氢醌脱氢酶), *Ann. Rev. Biochem.* 46:439—469.

## 论文

- Racker, E., and Stoerkenius, W., 1974. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation (催化由光推动的质子吸收和 ATP 形成的紫膜囊泡的重组), *J. Biol. Chem.* 249:662—663.
- Mitchell, P., 1976. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity (化学渗透偶联的定向化学反应和分子机理: 通过质子梯度而发生的能量传递), *Trans. Biochem. Soc.* 4:399—430.
- Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., and Kagawa, Y., 1977. Reconstitution of thermostable ATP ase capable of energy coupling from its purified subunits (从已纯化的亚基重组成能进行能量偶联的耐热的 ATP 酶), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:936—940.
- Skulachev, V. P., 1977. Transmembrane electrochemical  $H^+$ -Potential as a convertible energy source for the living cell (跨膜的电化学  $H^+$  势能是活细胞中可转换的能源). *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 74:1—9.
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., and Afzelius, B., 1962. A case of severe hyper-

metabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study (一种不是起源于甲状腺的, 其呼吸控制的维持有缺陷的严重代谢亢进: 一种相互关联的临床、生化和形态学研究), *J. Clin. Invest.* 41:1776—1804.

Erecinska, M., Wilson, D. F., and Nishiki, K., 1978. Homeostatic regulation of cellular energy metabolism: experimental characterization in vivo and fit to a model (细胞能量代谢的体内平衡调节: 体内的实验鉴定并检验一种模型是否适用), *Amer. J. Physiol.* 234:82—89.

## 历史方面

Racker, E., 1980. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics (从巴斯德到米切尔: 生物能学的一百年), *Fed. Proc.* 39:210—215.

Keilin, D., 1966. *The History of Cell Respiration and Cytochromes*. Cambridge University Press.

Kalckar, H. M., (ed.), 1969. *Biological Phosphorylations: Development of Concepts*. Prentice-Hall. [收集了关于氧化磷酸化和生物力能学其他方面的经典论文.]

Fruton, J. S., 1972. *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*. Wiley-Interscience. [书中从 262 页起有一篇关于细胞呼吸的精辟论述.]

## 第 15 章

### 入门读物

Horecker, B. L., 1976. Unravelling the pentose phosphate pathway (戊糖磷酸途径的阐明). In Kornberg, A., Cornudella, L., Horecker, B. L., and Oro, J., (eds.), *Reflections on Biochemistry*, pp. 65—72. Pergamon.

### 戊糖磷酸途径和葡糖异生的综述

Pontremoli, S., and Grazi, E., 1969. Hexose monophosphate oxidation(己糖单磷酸的氧化), *Compr. Biochem.* 17:163—189.

Pontremoli, S., and Grazi, E., 1968. Gluconeogenesis (葡糖异生作用). In Dickens, F., Randle, P. J., and Whelan, W. J., (eds.), *Carbohydrate Metabolism and Its Disorders*, vol. 1, pp. 259—295. Academic Press.

### 酶和反应机理

Horecker, B. L., 1964. Transketolase and transaldolase (转酮酶和转醛酶), *Compr. Biochem.* 15:48—70.

Scrutton, M. C., and Young, M. R., 1972. Pyruvate carboxylase (丙酮酸羧化酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 6, pp. 1—35. Academic Press.

Wood, H. G., and Barden, R. E., 1977. Biotin enzymes (生物素酶类), *Ann. Rev. Biochem.* 46:385—414.

Schultz, G. E., Schirmer, R. H., Sachsenheimer, W., and Pai, E. F., 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase (谷胱甘肽还原酶这种黄素酶的结构), *Nature* 273:120—124.

### 调节

Newsholme, E. A., and Start, C., 1973. *Regulation in Metabolism*. Wiley. [第六章讨论肝脏和肾脏皮质中糖酵解和葡糖异生的控制.]

- Soling, H. D., and Willms, B., (eds.), 1971. *Regulation of Gluconeogenesis*. Academic Press.
- Newsholme, E. A., and Crabtree, B., 1976. Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation. (代谢调节中和热的生成中的底物循环), *Biochem. Soc. Symp.* 41:61—109.
- Katz, J., and Rognstad, R., 1976. Futile cycles in the metabolism of glucose. (葡萄糖代谢中的无效循环), *Curr. Topics Cell Reg.* 10:238—287.
- Nordlie, R. C., 1974. Metabolic regulation by multifunctional glucose-6-phosphatase (多功能的葡萄糖-6-磷酸酶对代谢的调节), *Curr. Top. Cell Regul.* 8:33—111.
- Ureta, T., 1978. The role of isozymes in metabolism: A model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. (同功酶在代谢中的作用: 作为同功酶的生物学作用的基础的代谢途径的模型), *Curr. Top. Cell Regul.* 13:233—250.

## 遗传性疾病

- Beutler, E., 1978. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency (葡萄糖6-磷酸脱氢酶的缺乏). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1430—1451. McGraw-Hill.
- Luzzatto, L., Usanga, E. A., and Reddy, S., 1969. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. (缺乏葡萄糖6-磷酸脱氢酶的红细胞: 对疟原虫侵染的抗性), *Science* 164:839—842.
- Blass, J. P., and Gibson, G. E., 1977. Abnormality of a thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome. (维尔尼克-柯尔萨科夫综合症患者体内需要硫胺素的酶的反常现象), *New Engl. J. Med.* 297:1367—1370.

## 第 16 章

### 入门读物

- Cori, C. F., and Cori, G. T., 1947. Polysaccharide phosphorylase (多糖磷酸化酶). In *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* (1942—1962), pp. 186—206. American Elsevier (1964).
- Leloir, L. F., 1971. Two decades of research on the biosynthesis of saccharides (关于糖类生物合成的二十年的研究), *Science* 172:1299—1302.
- Kretchmer, N., 1972. Lactose and lactase (乳糖和乳糖酶), *Sci. Amer.* 227(4): 70—78. [关于乳糖酶缺乏的群体遗传学的有趣文章. 可见*Sci. Amer.* 单行本 1259.]

### 综述和专著

- Hers, H. G., 1976. The control of glycogen metabolism in the liver (肝脏中糖原代谢的控制), *Ann. Rev. Biochem.* 45:167—190.
- Fletterick, R. J., and Madsen, N. B., 1980. The structures and related functions of phosphorylase *a* (磷酸化酶 *a* 的结构和有关的功能), *Ann. Rev. Biochem.* 49:31—61.
- Krebs, E. G., and Preiss, J., 1975. Regulatory mechanisms in glycogen metabolism (糖原代谢中的调节机理). In Whelan, W. J., (ed.), *Biochemistry of Carbohydrates*, pp. 337—389. Butterworths.
- Dickens, F., Randle, P. J., and Whelan, W. J., (eds.), 1968. *Carbohydrate Metabolism and Its Disorders*, vols. 1 and 2. Academic Press. [综述论文的有价值的辑录. 第一卷为肝脏和肌肉中糖原代谢的综述, 第二卷为糖原-贮藏疾病和糖原代谢的其他紊乱的综述.]

Newsholme, E. A., and Start, C., 1973. *Regulation in Metabolism*. Academic Press. [第四章讨论糖原代谢的调节.]

Stalmans, W., and Hers, H. G., 1973. Glycogen synthesis from UDPG (从UDPG合成糖原). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 9, pp. 310—361. Academic Press.

### 磷酸化酶的结构

Madsen, N. B., Kasvinsky, P. J., and Fletterick, R. J., 1978. Allosteric transitions of phosphorylase *a* and the regulation of glycogen metabolism (磷酸化酶 *a* 的变构转变和糖原代谢的调节), *J. Biol. Chem.* 253:9097—9101. [根据变构转变的 x 射线结晶学研究提出的糖原代谢的控制机理.]

Weber, I. T., Johnson, L. N., Wilson, K. S., Yeates, D. G. R., Wild, D. L., and Jenkins, J. A., 1978. Crystallographic studies on the activity of glycogen phosphorylase *b* (关于糖原磷酸化酶 *b* 活性的结晶学研究), *Nature* 274:433—437.

### 遗传性疾病

Howell, R. R., 1978. The glycogen storage diseases (贮藏糖原的疾病). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 137—159. McGraw-Hill.

Segal, S., 1978. Disorders of galactose metabolism (半乳糖代谢的紊乱). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 160—181.

## 第 17 章

### 入门读物

Lynen, F., 1972. The pathway from “activated acetic acid” to the terpenes and fatty acids (从“活化的醋酸”到萜类和脂肪酸的途径). In *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* (1963—1970), pp. 103—138. American Elsevier (1973). [是作者关于脂肪酸降解和合成以及乙酰 CoA 和生物素作用的开拓性工作的简介.]

### 一般综述

Wakil, S. J., and Barnes, E. M., Jr., 1971. Fatty acid metabolism (脂肪酸代谢), *Compr. Biochem.* 18S:57—104.

Newsholme, E. A., and Start, C., 1973. *Regulation in Metabolism*. Wiley. [第四章和第七章讨论脂肪代谢的调节.]

### 脂肪酸氧化

McGarry, J. D., and Foster, D. W., 1980. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production (肝中脂肪酸氧化和酮体产生的调节), *Ann. Rev. Biochem.* 49:395—420.

Bressler, R., 1970. Fatty acid oxidation (脂肪酸氧化), *Compr. Biochem.* 18:331—359.

Garland, P. B., Shepherd, D., Nicholls, D. G., Yates, D. W., and Light, P. A., 1969. Interactions between fatty acid oxidation and the tricarboxylic acid cycle (脂肪酸氧化和三羧酸循环间的相互作用). In Lowenstein, J. M., (ed.), *Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation*, pp. 163—212. Dekker.



## 肉毒碱

Bremer, J., 1977. Carnitine and its role in fatty acid metabolism (肉毒碱及其在脂肪酸代谢中的作用), *Trends Biochem. Sci.* 2:207—209.

Fritz, I. B., 1968. The metabolic consequences of the effects of carnitine on long-chain fatty acid oxidation (肉毒碱影响长链脂肪酸氧化在代谢上的后果). In Gran, F. C., (ed.), *Symposium on Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism*, pp. 39—63. Academic Press.

Engel, W. K., Vick, N. A., Glueck, C. J., and Levy, R. I., 1970. A skeletal-muscle disorder associated with intermittent symptoms and a possible defect of lipid metabolism (与间歇症状相联系的骨骼-肌肉的紊乱和脂肪代谢中的一种可能的缺失), *N. Engl. J. Med.* 282:697—704.

## 脂肪的合成

Volpe, J. J., and Vagelos, P. R., 1976. Mechanism and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids (饱和脂肪酸生物合成的机理和调节), *Physiol. Rev.* 56:339—417.

Bloch, K., and Vance, D., 1977. Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids (饱和脂肪酸合成的控制机理), *Ann. Rev. Biochem.* 46: 263—298.

Lynen, F., 1972. Enzyme systems for fatty acid synthesis (脂肪酸合成的酶体系), *Biochem. Soc. Symp.* 35:5—26.

Lane, M. D., Moss, J., and Polakis, S. E., 1974. Acetyl coenzyme A carboxylase (乙酰辅酶A羧化酶), *Curr. Top. Cell Regul.* 8:139—187.

Numa, S., and Yamashita, S., 1974. Regulation of lipogenesis in animal tissues (动物组织中脂肪形成的调节), *Curr. Top. Cell Regul.* 8:197—239.

Utter, M. F., 1966. Metabolic roles of oxaloacetate (草酰乙酸在代谢中的作用). In Lowenstein, J. M., (ed.), *Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation*, pp. 249—296. [包括关于草酰乙酸将乙酰基运至细胞溶质中供脂肪酸合成之用的讨论.]

## 酶的机理

Wood, H. G., and Barden, R. E., 1977. Biotin enzymes (生物素酶), *Ann. Rev. Biochem.* 46: 385—413.

Alberts, A. W., and Vagelos, P. R., 1972. Acyl-CoA carboxylases (酰基-CoA 羧化酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 6, pp. 37—82. Academic Press.

Vagelos, P. R., 1973. Acyl group transfer (acyl carrier protein) [酰基的转移 (酰基载体蛋白)]. In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 8, pp. 155—199.

## 第 18 章

### 关于氨基酸代谢的专著

Meister, A., 1965. *Biochemistry of the Amino Acids* (2nd ed.), vols. 1 and 2. Academic Press.

Bender, D. A., 1975. *Amino Acid Metabolism*. Wiley.

Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F., (eds.), 1976. *The Urea Cycle*. Wiley.

### 反应机理

Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman. [有关于吡哆醛磷酸酶、钴胺素酶和加氧酶催化机理的精采论文.]

Snell, E. E., and DiMari, S. J., 1970. Schiff base intermediates in enzyme catalysis(酶催化中的希夫碱中间产物). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 2, pp. 335—370. Academic Press.

Barker, H. A., 1972. Coenzymes  $B_{12}$ -dependent mutases causing carbon chain rearrangements (引起碳链重排的依赖于辅酶  $B_{12}$  的变位酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 6, pp. 509—537.

Abeles, R., and Dolphin, D., 1976. The Vitamin  $B_{12}$  coenzyme (维生素  $B_{12}$  辅酶), *Acc. Chem. Res.* 9:114—120.

Corey, E. J., Cooper, N. J., and Green, M. L. H., 1977. Biochemical catalysis involving coenzyme B-12: a rational stepwise mechanistic interpretation of vicinal interchange rearrangements (与辅酶B-12有关的生化催化: 关于邻近的交换重排的一种合理的分步机理的解释), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:811—815.

### 遗传性紊乱

Nyhan, W. L., (ed.), 1975. *Hereditary Disorders of Amino Acid Metabolism*. Wiley.

Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), 1978. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), McGraw-Hill. [含有许多关于氨基酸代谢的遗传性紊乱的精采论文, 包括 V. E. Shih 关于赈循环紊乱, L. E. Rosenberg 关于维生素  $B_{12}$  代谢以及 A. Y. Tourian 和 J. B. Sidbury 关于苯丙酮尿的论文.]

Garrod, A. E., 1909. *Inborn Errors in Metabolism*. Oxford University Press (reprinted in 1963 with a supplement by H. Harris).

### 发现的过程

Childs, B., 1970. Sir Archibald Garrod's conception of chemical individuality: a modern appreciation (Archibald Garrod 醇上有关化学个性的概念: 现代评论), *New Engl. J. Med.* 282: 71—78.

Holmes, F. L., 1980. Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle (Hans Krebs 和鸟氨酸循环的发现), *Fed. Proc.* 39:216—225.

## 第 19 章

### 入门读物

Hinkle, P. C., and McCarty, R. E., 1978. How cells make ATP (细胞如何制造 ATP), *Sci. Amer.* 238(3):104—123.[关于光合磷酸化的简明讨论. 可见单行本 1383.]

Stoeckenius, W., 1976. The purple membrane of salt loving bacteria (嗜盐细菌的紫膜), *Sci. Amer.* 234(6):38—46. [报告以视黄醛为基础而不是以叶绿素为基础的光合机理的发现.]

Miller, K. R., 1979. The photosynthetic membrane (光合膜), *Sci. Amer.* 241(4):102—113.

Bassham, J. A., 1962. The path of carbon in photosynthesis (光合作用中的碳途径), *Sci. Amer.* 206(6):88—100.

## 综述

Arnon, D. I., 1977. Photosynthesis 1950—75: changing concepts and perspectives (1950—75 的光合作用: 变换中的概念和前景). In Trebst, A., and Avron, M., (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 5, New Series, pp. 7—56. Springer-Verlag. [着重讲光合磷酸化及铁氧还蛋白的作用.]

Halliwel, B., 1978. The chloroplast at work: a review of modern developments in our understanding of chloroplast metabolism (工作中的叶绿体: 关于叶绿体代谢知识现代进展的综述), *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33: 1—54. [着重讲叶绿体的暗反应.]

## 专著

Bonner, J., and Varner, J. E., (eds.), 1976. *Plant Biochemistry* (3rd ed.). Academic Press. [有 R. B. Park 关于叶绿体, M. D. Hatch 关于光合碳途径和 B. Kok 关于光合作用能量途径的文章.]

Gregory, R. P. F., 1977. *Biochemistry of Photosynthesis* (2nd ed.), Wiley.

Govindjee, (ed.), 1975. *Bioenergetics of Photosynthesis*. Academic Press.

Olson, J. M., and Hind, G., (eds.). *Chlorophyll-Proteins, Reaction Centers, and Photosynthetic Membranes*. Brook-haven Symposium in Biology, vol. 28.

## 光合作用的原初过程

Jagendorf, A. T., 1967. Acid-base transitions and phosphorylation by chloroplasts (叶绿体中的酸-碱互变和磷酸化), *Fed. Proc.* 26:1361—1369.

Blankenship, R. E., and Parson, W. W., 1978. The photochemical electron transfer reactions of photosynthetic bacteria and plants (光合细菌和植物的光化学电子传递反应), *Ann. Rev. Biochem.* 47:635—653.

Avron, M., 1977. Energy transduction in chloroplasts (叶绿体中的能量转换), *Ann. Rev. Biochem.* 46:143—155.

Radmer, R., and Kok, B., 1975. Energy capture in photosynthesis: photosystem II (光合作用中能量的捕获: 光系统 II), *Ann. Rev. Biochem.* 44:409—433.

Junge, W., 1977. Membrane potentials in photosynthesis (光合作用中的膜电位), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 503—536.

Stoeckenius, W., Lozier, R. H., and Bogomolni, R. A., 1979. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria (盐细菌的细菌视紫质和紫膜), *Biochem. Biophys. Acta* 505: 215—278.

## 光合作用中的碳固定

Zelitch, I., 1975. Pathways of carbon fixation in green plants (绿色植物中的碳固定途径), *Ann. Rev. Biochem.* 44:123—145.

Kelly, G. J., Latzko, E., and Gibbs, M., 1976. Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism (光合碳代谢的调节方面), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:181—205.

Jensen, R. G., and Bahr, J. T., 1977. Ribulose 1, 5-biphosphate carboxylase-oxygenase (核酮糖 1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:379—400.

## 光合蛋白质的结构

Fenna, R. E., and Matthews, B. W., 1975. Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola* (从绿硫细菌 *Chlorobium limicola* 中分离出来的一种细菌叶绿素-蛋白中叶绿素的排列), *Nature* 258:573—577.

Colman, P. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Murata, M., Norris, V. A., Ramshaw, J. A. M., and Venkatappa, M. P., 1978. X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution (2.7 Å 分辨率下质体蓝素的X射线晶体分析), *Nature* 272:319—324.

Baker, T. S., Eisenberg, D., and Eiserling, F., 1977. Ribulose biphosphate carboxylase: a two-layered, squareshaped molecule of symmetry 422 (核酮糖二磷酸羧化酶: 两层、方形的对称性422分子), *Science* 196:293—295.

## 第 20 章

### 入门读物

Bloch, K., 1965. The biological synthesis of cholesterol (胆固醇的生物合成), *Science* 150: 19—28.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1976. Receptormediated control of cholesterol metabolism (由受体调节的胆固醇代谢), *Science* 191:150—154.

### 关于脂类代谢的专著

Snyder, F., (ed.), 1977. *Lipid Metabolism in Mammals*, vols. 1 and 2. Plenum.

DeLuca, H. F., (ed.), 1978. *The Fat-Soluble Vitamins*. Plenum.

Wakil, S., (ed.), 1970. *Lipid Metabolism*. Academic Press.

Nes, W. R., and McKean, M. L., 1977. *Biochemistry of Steroids and Other Isopentanoids*. University Park Press.

### 酶及其反应机制

Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman. [书中对胆固醇生物合成的反应机制, 及从异戊烯焦磷酸演化而来的其他化合物的生物合成的反应机制, 均有精采的论述.]

Hayaishi, O., (ed.), 1974. *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Academic Press.

Holick, M. F., and Clark, M. B., 1978. The photobiogenesis and metabolism of vitamin D (维生素D的光生物发生及代谢), *Fed. Proc.* 37: 2567—2574.

McMurray, W. C., and Magee, W. L., 1972. Phospholipid metabolism (磷脂代谢), *Ann. Rev. Biochem.* 41: 129—160.

Gatt, S., and Barenholz, Y., 1973. Enzymes of complex lipid metabolism (复合酯代谢的酶), *Ann. Rev. Biochem.* 42: 61—85.

Popják, G., and Cornforth, J. W., 1960. The biosynthesis of cholesterol (胆固醇的生物合成), *Advan. Enzymol.* 22: 281—335.

Bloch, K., 1976. On the evolution of a biosynthetic pathway (一个生物合成途径的进化). In Kornberg, A., Horecker, B. L., Cornudella, L., and Oro, J., (eds.), *Reflections on Biochemistry*, pp. 143—150. Pergamon. [关于胆固醇及其他类固醇的进化的启发性论述.]

## 脂蛋白

Scanu, A. M., 1977. Plasma lipoprotein structure (血浆脂蛋白的结构), *Nature* 270:209—210.

Smith, L. C., Pownall, H. J., and Gotto, A. M., Jr., 1978. The plasma lipoproteins: structure and metabolism (血浆脂蛋白: 结构与代谢), *Ann. Rev. Biochem.* 47: 751—777.

## 调节作用

Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1974. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity (家族性高胆固醇血症: 脂蛋白与培养的成纤维细胞的结合有缺陷, 这与3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶的调节损伤有关). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71: 788—792.

Anderson, R. G. W., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts (损害脂蛋白受体功能的突变, 它影响脂蛋白受体集中到人成纤维细胞表面上有覆盖层的小坑中), *Nature* 270:695—699.

Goldstein, J. L., and Brown, M. S., 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis (低密度脂蛋白途径及其与动脉粥样硬化的关系), *Ann. Rev. Biochem.* 46: 897—930.

Dempsey, M. E., 1974. Regulation of steroid biosynthesis (甾类生物合成的调节), *Ann. Rev. Biochem.* 43: 967—990.

## 遗传性疾病

Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), 1978. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.). McGraw Hill. [书中有论述鞘脂、脂蛋白、胆固醇和甾类代谢的遗传性失调症的精采文章.]

Dietschy, J. M., Gotto, A. M., Jr., and Ontko, J. A., (eds.), 1978. *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism*. American Physiological Society.

## 第 21 章

### 专著

Bender, D. A., 1975. *Amino Acid Metabolism*. Wiley.

Meister, A., 1965. *Biochemistry of the Amino Acids* (2nd ed.), vols. 1 and 2. Academic Press. [关于氨基酸代谢的综合性权威论文.]

Prusiner, S., and Stadtman, E. R., (eds.), 1973. *The Enzymes of Glutamine Metabolism*. Academic Press. [收集了许多关于谷酰胺在氮代谢中的作用问题的有价值的论文.]

### 固氮作用

Mortenson, L. E., and Thorneley, R. N. F., 1979. Structure and function of nitrogenase (固氮酶的结构与功能), *Ann. Rev. Biochem.* 48:287—318.

Hageman, R. V., and Burris, R. H., 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate

and dissociate with each catalytic cycle (固氮酶和固氮酶还原酶随着每个催化循环而缔合和解离), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:2699—2702.

Wolff, T. E., Berg, J. M., Warrick, C., Hodgson, K. O., Holm, R. H., and Frankel, R. B., 1978. The molybdenum-iron-sulfur cluster complex  $[\text{Mo}_2\text{Fe}_2\text{S}_4(\text{SC}_2\text{H}_5)_4]^{3-}$ : a synthetic approach to the molybdenum site in nitrogenase (钼-铁-硫簇复合物  $[\text{Mo}_2\text{Fe}_2\text{S}_4(\text{SC}_2\text{H}_5)_4]^{3-}$ : 用合成的方法探讨固氮酶的钼部位), *J. Am. Chem. Soc.* 100:4630—4632.

## 一碳代谢

Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman. [第二十五章对一碳代谢的反应机制提供了精采的论述.]

Ridley, W. P., Dizikes, L. J., and Wood, J. M., 1977. Biomethylation of toxic elements in the environment (环境中有毒元素的生物甲基化作用), *Science* 197:329—332.

## 氨基酸的生物合成和调节

Stadtman, E. R., and Ginsburg, A., 1974. The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control (大肠杆菌的谷酰胺合成酶: 结构与控制). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 10, pp. 755—807. Academic Press.

Rhee, S. G., Park, R., Chock, P. B., and Stadtman, E. R., 1978. Allosteric regulation of monocyclic interconvertible enzyme cascade systems: use of *Escherichia coli* glutamine synthetase as an experimental model (可以相互转变的单环酶级联体系的变构调节: 大肠杆菌谷酰胺合成酶作为实验模型的应用), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75: 3138—3142.

Umbarger, H. E., 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation (氨基酸生物合成及其调节), *Ann. Rev. Biochem.* 47:533—606. [细菌中氨基酸生物合成的精采评述性论文.]

Yanofsky, C., and Crawford, I. P., 1972. Tryptophan synthetase (色氨酸合成酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 7, pp. 1—31.

## 铁和血红素代谢

Smith, K. M., (ed.), 1976. *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier.

Porter, R., and Fitzsimons, D. W., (eds.), 1976. *Iron Metabolism*. Ciba Foundation Symposium, vol. 51 (New Series). Elsevier.

Maines, M. D., and Kappas, A., 1977. Metals as regulators of heme metabolism (金属作为血红素代谢的调节物), *Science* 198:1215—1221.

Granick, S., and Beale, S. I., 1978. Hemes, chlorophylls, and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation (血红素、叶绿素及有关的化合物: 生物合成及代谢调节), *Advan. Enzymol.* 40: 33—203. [精采的评述性论文.]

Meyer, U. A., and Schmid, R., 1978. The porphyrias (卟啉症). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1166—1220. McGraw-Hill.

## 第 22 章

### 专著和综述

Kornberg, A., 1980. *DNA Replication*. Freeman. [第二章对DNA前体的生物合成做了精采的评

述.]

Henderson, J. F., and Paterson, A. R. P., 1973. *Nucleotide Metabolism: An Introduction*. Academic Press.

Elliott, K., and Fitzsimons, D. W., (eds.), 1977. *Purine and Pyrimidine Metabolism*. Ciba Foundation Symposium 48.

Blakley, R. L., 1969. *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*. North-Holland.

Walsh, C., 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman. [清晰地叙述了核苷酸生物合成中的几个重要反应机制。第五章讨论氨基转移, 第十三章讨论黄嘌呤氧化酶, 第二十五章讨论一碳转移.]

Kelley, W. N., and Weiner, I. M., (eds.), 1978. *Uric Acid*. Springer-Verlag. [一本有用的书, 收集了关于尿酸的生物化学和生理学、痛风和嘌呤代谢的评述文章.]

Jones, M. E., 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis (动物嘧啶核苷酸生物合成: 基因、酶和 UMP 生物合成的调节), *Ann. Rev. Biochem.* 49:253—279.

### 天冬氨酸转氨甲酰酶

Kantrowitz, E. V., Pastra-Landis, S. C., and Lipscomb, W. N., 1980. *E. coli* aspartate transcarbamylase. Part II: Structure and allosteric interactions (大肠杆菌天冬氨酸转氨甲酰酶, 第二部分: 结构与变构相互作用), *Trends Biochem. Sci.* 5:150—153.

Gerhart, J. C., 1970. A discussion of the regulatory properties of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. (关于大肠杆菌天冬氨酸转氨甲酰酶的调节性质的讨论), *Curr. Top. Cell Regul.* 2:275—325.

Jacobson, G. R., and Stark, G. R., 1973. Aspartate transcarbamylases (天冬氨酸转氨甲酰酶). In Boyer, P. D., (ed.), *The Enzymes* (3rd ed.), vol. 9, pp. 225—308. Academic Press.

Monaco, H. L., Crawford, J. L., and Lipscomb, W. N., 1978. Three-dimensional structures of aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli* and of its complex with cytidine triphosphate (大肠杆菌天冬氨酸转氨甲酰转移酶以及它与胞苷三磷酸的复合物的三维结构), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:5276—5280.

Hensley, P., and Schachman, H. K., 1979. Communication between dissimilar subunits in aspartate transcarbamoylase: effect of inhibitor and activator on the conformation of the catalytic polypeptide chains (天冬氨酸转氨甲酰酶中不同亚基之间的通讯交流: 抑制剂和活化剂对有催化活力的多肽链构象的影响), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 3732—3736.

### 核苷二磷酸还原酶

Thelander, L., and Reichard, P., 1979. Reduction of ribonucleotides (核苷酸的还原), *Ann. Rev. Biochem.* 48: 133—158.

Holmgren, A., Soderberg, B. -O., Eklund, H., and Brändén, C. -I., 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S<sub>2</sub> to 2.8 Å resolution (大肠杆菌硫氧还蛋白 S<sub>2</sub> 至 2.8 Å 分辨率的三维结构), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:2305—2309.

Holmgren, A., 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione (依赖于谷胱甘肽的大肠杆菌核苷-二磷酸还原酶的氢供体系统), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73:2275—2279. [使核苷酸还原酶还原的新的谷氧还蛋白体系的发现.]

## 其他酶

Coleman, P. F., Suttle, D. P., and Stark, G. R., 1977. Purification from hamster cells of the multifunctional protein that initiates de novo synthesis of pyrimidine nucleotides (仓鼠细胞内使嘧啶核苷酸开始从头合成的多功能蛋白的纯化), *J. Biol. Chem.* 252:6379—6385.

Pagolotti, A. L., Jr., and Santi, D. V., 1977. The catalytic mechanism of thymidylate synthetase (胸苷酸合成酶的催化机制), *Bioorg. Chem.* 1:277—311

Matthews, D. A., Alden, R. A., Bolin, J. T., Freer, S. T., Hamlin, R., Xuong, N., Kraut, J., Williams, M., Poe, M., and Hoogsteen, K., 1977. Dihydrofolate reductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate (二氢叶酸还原酶: 与氨甲蝶呤形成的二元复合物的 x 射线结构), *Science* 197:452—455.

Benkovic, S. J., 1980. On the mechanism of action of folate-and bioppterin-requiring enzymes (需要叶酸和生物喋呤的酶的作用机制), *Ann. Rev. Biochem.* 49:227—251.

## 先天性紊乱症

Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), 1978. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (4th ed.), McGraw-Hill. [关于嘌呤和嘧啶代谢先天性紊乱症的章节内容精采; 关于痛风和 Lesch-Nyhan 综合症, 请参见 J. B. Wyngaarden 和 W. B. Kelley 的文章; 关于乳清酸酸性尿, 请参见 W. N. Kelly 和 L. H. Smith, Jr. 的文章, 以及有关黄嘌呤尿症, 参见 J. B. Wyngaarden 的文章.]

Seegmiller, J. E., 1980. In Bundy, P. K., and Rosenberg, L. E., (eds.), *Metabolic Control and Disease* (8th ed.), pp. 777—937. Saunders. [关于嘌呤和嘧啶代谢病的精采论述.]

## 第 23 章

### 入门读物

Newsholme, E. A., and Start, C., 1973. *Regulation in Metabolism*. Wiley. [这是一篇关于糖类和脂肪代谢控制的精采叙述.]

Stalmans, W., 1976. The role of the liver in the homeostasis of blood glucose (肝在血糖体内平衡中的作用), *Curr. Top. Cell Regul.* 11:51—97.

Cahill, G. F., Jr., 1976. Starvation in man (人的饥饿), *Clin. Endocrinol. Metab.* 5: 397—415.

Newsholme, E. A., 1980. A possible metabolic basis for the control of body weight (控制体重的一个可能的代谢基础), *New. Eng. J. Med.* 302:400—405. [介绍一种假说, 提出肥胖是由于底物通过成对相反反应的循环减慢而产生. 例如, 由磷酸果糖激酶和果糖 1, 6-二磷酸酶所催化的那些 成对的相反反应.]

### 专著

Bondy, P. K., and Rosenberg, L. E., (eds.), 1980. *Metabolic Control and Disease*. Saunders.

Lundquist, F., and Tygstrup, N., (eds.), 1974. *Regulation of Hepatic Metabolism*. Munksgaard. [含有关于肝的整合统一作用的文章.]

Howald, H., and Poortmans, J. R., (eds.), 1975. *Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise*. Birkhauser Verlag, Basel.



Atkinson, D. E., 1977. *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. Academic Press.

## 糖类代谢

Felig, P., 1980. Disorders of carbohydrate metabolism (糖类代谢紊乱). In Bondy, P. K., and Rosenberg, L. E., (eds.), *Metabolic Control and Disease*. Saunders. [精采的评述论文, 关于糖类代谢的控制及其与蛋白质和脂类代谢关系问题.]

Esmann, V., (ed.), 1978. *Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism*. Pergamon Press.

Cahill, G. F., Jr., and Owen, O. E., 1968. Some observations on carbohydrate metabolism in man. (关于人的糖类代谢的一些观察). In Dickens, F., Randle, P. J., and Whelan, W. J., (eds.), *Carbohydrate Metabolism and Its Disorders*, vol. 1, pp. 497—522. Academic Press.

## 葡糖异生作用

Snell, K., 1979. Alanine as a gluconeogenic carrier (丙氨酸是葡糖异生作用的载体), *Trends Biochem. Sci.* 4: 124—128.

Hanson, R., and Mehlman, M., (ed.), 1976. *Gluconeogenesis*. Wiley.

## 氨基酸代谢

Felig, P., 1975. Amino acid metabolism in man (人的氨基酸代谢), *Ann. Rev. Biochem.* 44: 933—955.

Dice, J. F., Walker, C. D., Byrne, B., and Cardiel, A. 1978. General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. (糖尿病和饥饿条件下蛋白质降解的一般特性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:2093—2097.

## 脂类代谢

McGarry, J. D., and Foster, D. W., 1980. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production (肝的脂肪酸氧化及酮体制造的调节), *Ann. Rev. Biochem.* 49:395—420.

McGarry, J. D., Takabayashi, Y., and Foster, D. W., 1978. The role of malonyl CoA in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. (丙二酸单酰 CoA 在协调离体大鼠肝细胞内脂肪酸合成和氧化方面的作用), *J. Biol. Chem.* 253:8294—8300.

Williamson, D. H., 1979. Recent developments in ketone-body metabolism. (酮体代谢的最新进展), *Biochem. Soc. Trans.* 7:1313—1321.

Odum, E. P., 1965. Adipose tissue in migratory birds. (候鸟的脂肪组织). In Renold, A. E., and Cahill, G. F., (eds.), *Handbook of Physiology*, Section 5, *Adipose Tissue*, pp. 37—43. American Physiological Society.

Taylor, S. I., and Jungas, R. L., 1974. Regulation of lipogenesis in adipose tissue (脂肪组织中脂类形成的调节), *Arch. Biochem. Biophys.* 164:12—19.

McGarry, J. D., and Foster, D. W., 1977. Hormonal control of ketogenesis (生酮作用的激素控制), *Arch. Intern. Med.* 137:495—501.

Grey, N. J., Karl, I., and Kipnis, D. M., 1975. Physiologic mechanisms in the development of starvation ketosis in man (人饥饿酮病发展过程中的生理机制), *Diabetes* 24: 10—16.

## 细胞和组织的光谱术

Shulman, R. G., Brown, T. R., Ugurbil, K., Ogawa, S., Cohen, S. M., den Hollander, J. A., 1979. Cellular applications of  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance ( $^{31}\text{P}$ 和 $^{13}\text{C}$ 核磁共振在细胞学方面的应用), *Science* 205: 160—166. [这个新方法在追踪完整细胞和组织内发生的代谢事件方面, 可以提供极为丰富的数据. 本文评述了这个新方法.]

McLaughlin, A. C., Takeda, H., and Chance, B., 1979. Rapid ATP assays in perfused mouse liver by  $^{31}\text{P}$  NMR (用 $^{31}\text{P}$  NMR 法对经灌注的大鼠肝内ATP进行快速分析), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 5445—5449. [在监测完整器官的代谢作用方面是一个有希望的方法.]

## 第 24 章

### 入门读物

Kornberg, A., 1979. Aspects of DNA replication (DNA复制的有关方面), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:1—9.

Alberts, B., and Sternglanz, R., 1977. Recent excitement in the DNA replication problem (DNA 复制问题中的近年令人兴奋的进展), *Nature* 269:655—661.

Fiddes, J. C., 1977. The nucleotide sequence of a viral DNA (一种病毒DNA的核苷酸顺序), *Sci. Amer.* 237(6):54—67. [可见*Sci. Amer.* 单行本1374.]

Hamilton, H. O., 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases (限制性核酸内切酶的核苷酸顺序特异性), *Science* 205:455—622.

Nathans, D., 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics. (限制性核酸内切酶、猿病毒40以及新遗传学), *Science* 206:903—909.

Bauer, W. R., Crick, F. H. C., and White, J. H., 1980. Supercoiled DNA (超旋DNA), *Sci. Amer.* 243 (1):118—133. [关于DNA超螺旋拓扑学的一个流畅的描述. 单行本1474.]

### 专著

Kornberg, A., 1980. *DNA Replication*. Freeman. [一本杰出和易懂的书.]

Cold Spring Harbor Laboratory, 1979. *Replication and Recombination*. Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology, vol. 43. [一本极富知识性的关于 DNA 复制、修复和重组文章的综合汇编.]

Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., and Tinoco, I., Jr., 1974. *Physical Chemistry of Nucleic Acids*. Harper & Row.

Davidson, J. N., 1977. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. Academic Press.

Ts'o, P. O. P., 1974. *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, vol. 1 and 2. Academic Press.

### 主要概念的发现

Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III (关于诱导肺炎球菌转型物质的化学本质的研究. 一个由Ⅲ型肺炎球菌中分离获得的脱氧核糖核酸组分的诱导转化作用), *J. Exp. Med.* 79:137—158.

Hershey, A. D., and Chase, M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage (在噬菌体生长中病毒蛋白质和核酸的各自独立的功能), *J. Gen. Physiol.* 36: 39—56.

Watson, J. D., and Crick, F. H. C., 1953a. Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid(核酸的分子结构. 脱氧核糖核酸的一种结构), *Nature.* 171:737—738.

Watson, J. D., and Crick, F. H. C., 1953b. Genetic implications of the structure of deoxyribo-nucleic acid (脱氧核糖核酸结构的遗传学含义), *Nature.* 171:964—967.

Kornberg, A., 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid (脱氧核糖核酸的生物合成), *Science.* 131:1503—1508.

Meselson, M., and Stahl, F. W., 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli* (大肠杆菌中的DNA复制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44:671—682.

Taylor, J. H., (ed.), 1965. *Selected Papers on Molecular Genetics.* Academic Press. (含有上列的经典文章.)

### DNA顺序测定

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (利用链终止抑制剂的DNA顺序测定法), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5463—5467.

Maxam, A. M., and Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA (一个测定DNA 顺序的新方法), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:560—564.

### 与DNA复制有关的蛋白质

Wickner, S. H., 1978. DNA replication proteins of *Escherichia coli* (大肠杆菌的DNA 复制蛋白质), *Ann. Rev. Biochem.* 47:1163—1191.

Lehman, I. R., 1974. DNA ligase: structure, mechanism, and function. (DNA连接酶: 结构、机制和功能), *Science* 186:790—797.

McHenry, C., and Kornberg, A., 1977. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*: purification and resolution into subunits (大肠杆菌 DNA 聚合酶Ⅲ全酶: 纯化及亚基解离), *J. Biol. Chem.* 252:6478—6484.

Rowen, L., and Kornberg, A., 1978. Primase, the dna G protein of *Escherichia coli*: an enzyme which starts DNA chains (大肠杆菌的 dna G 蛋白或引物酶: 一个能起始DNA链的酶), *J. Biol. Chem.* 253:758—764.

Kornberg, A., Scott, J. F., and Bertsch, L. L., 1978. ATP utilization by *rep* protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork ( *rep* 蛋白在复制叉处催化 DNA 链分离时对 ATP 的利用), *J. Biol. Chem.* 253:3298—3304.

Cozzarelli, N. R., 1977. The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis (DNA 合成中抑制剂作用的机制), *Ann. Rev. Biochem.* 46:641—668.

### DNA 复制的原点和方向

Prescott, D. M., and Kuempel, P. L., 1972. Bidirectional replication of the chromosome in *E. coli* (大肠杆菌中染色体的双向复制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69:2842—2845.

Bird, R. E., Lourarn, J., Martuscelli, J., and Caro, L., 1972. Origin and sequence of chromosome replication in *E. coli* (大肠杆菌中染色体复制的起点和顺序), *J. Mol. Biol.* 70: 549—566.

Ogawa, T., and Okazaki, T., 1980. Discontinuous DNA replication (不连续 DNA 复制), *Ann. Rev. Biochem.* 49:421—458.

## DNA结构

Cantor, C. R., and Schimmel, P. R., 1980. *Biophysical Chemistry*. Freeman. [第Ⅰ部分的第三和六章, 第Ⅱ部分的二十二、二十三、二十四章对核酸的构象有极好的描述.]

## 超螺旋DNA

Bauer, W. R., 1978. Structure and reactions of closed duplex DNA (封闭 DNA 双螺旋的结构和反应), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7:287—313.

Crick, F. H. C., 1976. Linking numbers and nucleosomes (联结数和核小体), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73:2639—2643. [对超螺旋 DNA 的联结、扭曲和缠绕作了清楚的介绍.]

Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Gellert, M., 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme (DNA 回旋酶: 纯化酶的亚基结构和ATP酶活性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:5960—5963.

Cozzarelli, N. R., 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA (DNA 回旋酶和 DNA 的超螺旋), *Science* 207:953—960.

## DNA修复

Hanawalt, P. C., Cooper, P. K., Ganesan, A. K., and Smith, C. A., 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells (细菌和哺乳动物细胞中的 DNA 修复), *Ann. Rev. Biochem.* 48:783—836.

Lindahl, T., Ljungquist, S., Siebert, W., Nyberg, B., and Sperens, B., 1977. DNA N-glycosidases. Properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli* (DNA N-糖苷酶, 大肠杆菌中的尿嘧啶-DNA糖苷酶的性质), *J. Biol. Chem.* 252:3286—3294.

Cleaver, J. E., 1978. Xeroderma pigmentosum (着色性干皮病). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1072—1095. McGraw-Hill.

## 回忆及历史性的记载

Cairns, J., Stent, G. S., and Watson, J. D., (eds.), 1966. *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory. [分子生物学的缔造者的令人神往的回忆录汇集.]

Watson, J. D., 1968. *The Double Helix*. Atheneum. [一个关于 DNA 结构及其生物学含义的发现的生动的个人记述.]

Olby, R., 1974. *The Path to the Double Helix*. University of Washington Press.

Portugal, F. H., and Cohen, J. S., 1977. *A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance*. MIT Press.

Judson, H., 1979. *The Eighth Day of Creation*. Simon and Schuster.

## 第 25 章

### 入门读物

Miller, O. L., Jr., 1973. The visualization of genes in action (行动中基因的目测观察), *Sci. Amer.* 228(3):34—42.

Spiegelman, S., 1964. Hybrid nucleic acids (杂交核酸), *Sci. Amer.* 210(5):48—56.

Chamberlin, M. J., 1976. RNA polymerase: an overview (RNA 聚合酶: 综合介绍). In

Losick, R., and Chamberlin, M., (eds.), *RNA Polymerase*, pp. 17—67. Cold Spring Harbor Laboratory.

### 信使RNA的发现

Jacob, F., and Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. (蛋白质合成时的遗传调控机理), *J. Mol. Biol.* 3:318—356.

Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M., 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis(蛋白质合成时把信息从基因带到核糖体的一种不稳定中间物), *Nature*. 190:576—581.

Hall, B. D., and Spiegelman, S., 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA (T2-DNA与T2-特异RNA的顺序互补性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47:137—146.

### RNA聚合酶

Losick, R., and Chamberlin, M., (eds.), 1976. *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory. [内有许多优秀文章.]

Chamberlin, M. J., 1974. The selectivity of transcription (转录的选择), *Ann. Rev. Biochem.* 43:721—776.

Travers, A., 1976. RNA polymerase specificity and the control of growth (RNA聚合酶的特异性及生长控制), *Nature*. 263:641—646.

### 转录的起始

Hayashi, M., Hayashi, M. N., and Spiegelman, S., 1963. Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA (体内基因转录被限制于DNA互补链之一), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50:664—672.

Taylor, K., Hradecna, Z., and Szybalski, W., 1967. Asymmetric distribution of the transcribing regions on the complementary strands of coliphage  $\lambda$  DNA (大肠杆菌噬菌体 $\lambda$  DNA的互补链上转录区域的不对称性分布), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 57:1618—1625.

Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., and Bautz, E. K. F., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase (RNA聚合酶的刺激转录因子), *Nature*. 221:43—46. [sigma因子的发现.]

Gilbert, W., 1976. Starting and stopping sequences for the RNA polymerase (RNA聚合酶的起始及终止序列). In Losick, R., and Chamberlin, M., (eds.), *RNA Polymerase*, pp. 193—205. Cold Spring Harbor Laboratory.

Reznikoff, W. S., and Abelson, J. N., 1978. The *lac* promoter [*lac* (乳糖) 启动子]. In Miller, J. H., and Reznikoff, W. S., (eds.), *The Operon*, pp. 221—243. Cold Spring Harbor Laboratory. [内有29个启动子序列的比较.]

### 转录的终止

Adhya, S., and Gottesman, M., 1978. Control of transcription termination (转录终止的控制), *Ann. Rev. Biochem.* 47:967—996.

Das, A., Merril, C., and Adhya, S., 1978. Interaction of RNA polymerase and rho in transcription termination: coupled ATPase. (转录终止时RNA聚合酶和rho因子相互作用; 偶联ATP酶), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:4828—4832.

Wu, A. M., and Platt, T., 1978. Transcription termination: nucleotide sequence at 3' end of tryptophan operon in *Escherichia coli* (转录终止: 大肠杆菌色氨酸操纵子3'末端的核苷酸序列), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:5442—5446.

### RNA合成的抗菌素抑制剂

Goldberg, I. H., and Friedman, P. A., 1971. Antibiotics and nucleic acids (抗菌素与核酸), *Ann. Rev. Biochem.* 40:775—810.

Sobell, H. M., 1974. How actinomycin binds to DNA (放线菌素如何与DNA结合), *Sci. Amer.* 231(2):82—91.

### RNA加工

Perry, R. P., 1976. Processing of RNA. (RNA加工), *Ann. Rev. Biochem.* 45:605—630.

Steitz, J. A., and Young, R. A., 1978. Complementary sequences 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. (距大肠杆菌核糖体前体RNA的核糖核酸酶Ⅲ切点1700核苷酸处的互补顺序), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:3593—3597.

Altman, S., 1978. Biosynthesis of tRNA (tRNA的生物合成). In Altman, S., (ed.), *Transfer RNA*, pp. 48—77, MIT Press.

### RNA顺序分析

Peattie, D. A., 1979. Direct chemical method for sequencing RNA (RNA顺序分析的直接化学法), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:1760—1764.

Simonsits, A., Brownlee, G. G., Brown, R. S., Rubin, J. R., and Guilley, H., 1977. New rapid gel sequencing method for RNA (新的快速凝胶RNA顺序分析法), *Nature.* 269:833—836.

## 第 26 章

### 入门读物

Yanofsky, C., 1967. Gene structure and protein structure (基因结构和蛋白质结构), *Sci. Amer.* 216(5):80—94. [内容包括共线性的证明.]

Nirenberg, M. W., 1963. The genertic code II (遗传密码Ⅱ), *Sci. Amer.* 208(3):80—94. [描述用人工合成的多核苷酸解译密码.]

Crick, F. H. C., 1966. The genetic code III (遗传密码Ⅲ), *Sci. Amer.* 215 (4):55—62. [在接近完全阐明时对密码的一种看法.]

Kourilsky, P., and Chambon, P., 1978. The ovalbumin gene: an amazing gene in eight pieces (卵清蛋白基因: 一个具有八个片段的令人惊异的基因), *Trends Biochem. Sci.* 3:244—247.

### 接合器 (tRNA) 假说

Crick, F. H. C., 1958. On protein synthesis (关于蛋白质合成), *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12:138—163. [关于蛋白质合成问题的卓越的预见性讨论. 在此文中提出了接合器假说.]

### 遗传密码

Crick, F. H. C., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. J., 1961. General nature of the genetic code for proteins (蛋白质遗传密码的一般性质), *Nature* 192:1227—1232.

Khorana, H. G., 1968. Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code (遗传密码研究中的核酸合成). In *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* (1963—1970), pp. 341—369. American Elsevier (1973).

Nirenberg, M., 1968. The genetic code (遗传密码). In *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* (1963—1970), pp. 372—395. American Elsevier (1973).

Garen, A., 1968. Sense and nonsense in the genetic code (遗传密码中的有意义和无意义), *Science* 160:149—159.

Woese, C. R., 1967. *The Genetic Code*. Harper & Row.

Cold Spring Harbor Laboratory, 1966. *The Genetic Code* (Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 31). [确定密码主要特征的一册杰出论文集.]

## 交搭基因

Barrell, B. G., Air, G. M., and Hutchinson, C. A., III, 1976. Overlapping genes in bacteriophage  $\phi$  X174. (噬菌体中 $\phi$ X174中的交搭基因), *Nature* 264:34—40.

## 基因和蛋白质的共线性

Yanofsky, C., Carlton, B. C., Guest, J. R., Helinski, D. R., and Henning, U., 1964. On the colinearity of gene structure and protein structure (关于基因结构和蛋白质结构的共线性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 51:266—272.

Sarabhai, A. S., Stretton, O. W., Brenner, S., and Bolle, A., 1964. Colinearity of gene with polypeptide chain (基因和多肽链的共线性), *Nature* 201:13—17.

## 分隔基因和间隔顺序

Crick, F., 1979. Split genes and RNA splicing in evolution of eukaryotic cells (真核细胞进化中的分隔基因和RNA拼接), *Science* 202:1257—1260.

Jeffreys, A. J., and Flavell, R. A., 1977. The rabbit  $\beta$ -globin gene contains a large insert in the coding sequence (兔 $\beta$ -珠蛋白基因在其编码顺序中含有一个巨大的插入顺序), *Cell* 12:1097—1108.

Breathnach, R., Mandel, J. L., and Chambon, P., 1977. Ovalbumin gene is split in chicken DNA (鸡DNA中的卵清蛋白基因是分隔的), *Nature* 270: 314—319.

Cochet, M., Gannon, F., Hen, R., Maroteaux, L., Perrin, F., and Chambon, P., 1979. Organisation and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene (含十七个片段的鸡伴清蛋白基因的结构和顺序研究), *Nature* 282:567—574.

Tilghman, S. M., Tiemeier, D. C., Seidman, J. G., Peterlin, B. M., Sullivan, M., Majjel, J. V., and Leder, P., 1978. Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse  $\beta$ -globin gene (小鼠 $\beta$ -珠蛋白基因结构部分的DNA间隔顺序), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:725—729.

## 诱变作用

Hayes, W., 1968. *The Genetics of Bacteria and Their Viruses* (2nd ed.). Wiley. [第十三章关于突变本质的描述清晰而简明.]

Drake, J. W., and Baltz, R. H., 1976. The biochemistry of mutagenesis (诱变作用的生物化学), *Ann. Rev. Biochem.* 45:11—38.

Drake, J. W., 1970. *The Molecular Basis of Mutation*. Holden-Day.

## 致癌物的探测

Ames, B. N., 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer (环境中致突变和致癌的化学物质的检定), *Science* 204:587—593.

Devoret, R., 1979. Bacterial tests for potential carcinogens (潜在致癌物质的细菌检验法), *Sci. Amer.* 241(2):40—49.

McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J., and Ames, B. N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids (致癌物质的诱变作用探测法: 具有 R 因子质粒的细菌测试品系), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:979—983.

## 第 27 章

### 入门读物

Miller, O. L., Jr., 1973. The visualization of genes in action (工作中的基因的显象), *Sci. Amer.* 228(3):34—42.

Rich, A., and Kim, S. H., 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA (转移 RNA 的三维空间结构), *Sci. Amer.* 238 (1):52—62.

Clark, B. F. C., and Marcker, K. A., 1968. How proteins start (蛋白质如何起始), *Sci. Amer.* 218(1):36—42.

### 有关蛋白质合成的专著

Weissbach, H., and Pestka, S., (eds.), 1977. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*. Academic Press. [包含关于蛋白质合成的合成酶, 核糖体结构与功能、起始、延长、移位、终止和抗菌素抑制剂等文章.]

Cold Spring Harbor Laboratory, 1969. *Mechanisms of Protein Biosynthesis* (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, vol. 34).

### 核糖体

Nomura, M., Tissieres, A., and Lengyel, P., (eds.), 1975. *Ribosomes*. Cold Spring Harbor Laboratory. [含有关于核糖体结构、功能和装配的优秀综述.]

Brimacombe, R., Stoffer, G., and Wittmann, H. G., 1978. Ribosome structure (核糖体结构), *Ann. Rev. Biochem.* 47:217—249.

Wittman, H. G., 1977. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes (大肠杆菌核糖体的结构与功能), *Fed. Proc.* 36: 2025—2080.

Nomura, M., 1973. Assembly of bacterial ribosomes (细菌核糖体的装配), *Science*. 179:864—873.

### 转移 RNA

Schimmel, P., Söll, D., and Abelson, J., (eds.), 1979. *Transfer RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory. [第一部分论述了 tRNA 的结构、性质和识别, 第二部分是其生物合成和基因概况. 这是一篇有权威性和有价值的专题论文.]

Kim, S. -H., 1978. Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications (转移 RNA 的三维空间结构及其功能的含义), *Advan. Enzymol.* 46:279—315.



Jack, A., Ladner, J. E., and Klug, A., 1976. Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution (酵母苯丙氨酸转移RNA在分辨率2.5 Å下的结晶学改进), *J. Mol. Biol.* 108:619—649.

Sussman, J. L., and Kim, S. -H., 1976. Three-dimensional structure of a transfer RNA in two crystal forms (两种结晶状态转移RNA的三维空间结构), *Science* 192:853—858.

### 氨基酰-tRNA合成酶

Schimmel, P. R., and Söll, D., 1979. Amino acyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs (氨基酰-tRNA合成酶: 一般概况及对转移RNA的识别), *Ann. Rev. Biochem.* 48:601—648.

### 起始、延长和终止

Dintzis, H. M., 1961. Assembly of the peptide chains of hemoglobin (血红蛋白多肽链的装配), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47: 247—261. [这些重要的脉冲-标记实验表明, 蛋白质是从氨基端到羧基端合成的.]

Steitz, J. A., 1979. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA (信使RNA的遗传信号及核苷酸顺序), In Goldberger, R. F., (ed.), *Biological Regulation and Development*, vol.1, pp. 349—399. Plenum.

Shine, J., and Dalgarno, L., 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites (大肠杆菌16S核糖体RNA的3'-末端的顺序: 与无意义三联体和核糖体结合部位的互补), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:1342—1346.

Steitz, J. A., and Jakes, K., 1975. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3'-terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli* (核糖体如何选择mRNA的起始区: 大肠杆菌16S rRNA的3'-末端在蛋白质合成起始时和mRNA间形成碱基对), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 4734—4738.

Gupta, S. L., Waterson, J., Sopori, M., Weissman, S. M., and Lengyel, P., 1971. Movement of the ribosome along the messenger ribonucleic acid during protein synthesis (蛋白质合成时核糖体沿信使RNA移动), *Biochemistry* 10:4410—4421.

Kaziro, Y., 1978. The role of GTP in polypeptide chain elongation (GTP在多肽链延长中的作用), *Biochim. Biophys. Acta* 505:95—127.

### 翻译的忠实性

Fersht, A., and Dingwall, C., 1979. Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein biosynthesis (在蛋白质生物合成中证明存在着叠加过筛的校辑机制), *Biochemistry*. 18:2627—2631.

### 抗菌素和毒素

Pestka, S., (1971). Inhibitors of ribosome function (核糖体功能的抑制剂), *Ann. Rev. Microbiol.* 25:487—562.

Jimenez, A., 1976. Inhibitors of translation (翻译的抑制剂), *Trends Biochem. Sci.* 1:28—29.

Tai, P. -C., Wallace, B. J., and Davis, B. D., 1978. Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation (链霉素在起始后通过与核糖体相互作用致使正常信使读码错误), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75: 275—279.

## 非核糖体的肽合成

Lipmann, F., 1971. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis (绘制肽生物合成进化进程图的尝试), *Science* 173:875—884.

Perlman, D., and Bodanszky, M., 1971. Biosynthesis of peptide antibiotics (肽类抗菌素的生物合成), *Ann. Rev. Biochem.* 40:449—464.

Lipmann, F., 1973. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyanzyme templates (在多酶模板上非核糖体的多肽合成), *Acc. Chem. Res.* 6:361—367.

## 第 28 章

### 入门读物

Jacob, F., and Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins (蛋白质合成中的遗传调节机制), *J. Mol. Biol.* 3:318—356. [在这篇高超文章中提出了操纵子模型和信使RNA概念.]

Ptashne, M., and Gilbert, W., 1970. Genetic repressors (遗传阻遏物), *Sci. Amer.* 222(6):36—44.

Maniatis, T., and Ptashne, M., 1976. A DNA operator-repressor system (一个DNA操纵基因-阻遏物系统), *Sci. Amer.* 234(1):64—76.

### 乳糖操纵子

Miller, J. H., and Reznikoff, W. S., (eds.), 1978. *The Operon*. Cold Spring Harbor Laboratory [有关大肠杆菌及入噬菌体中调节作用文章的优秀汇编. 详细讨论了乳糖、色氨酸、阿拉伯糖、组氨酸及半乳糖操纵子.]

Gilbert, W., and Muller-Hill, B., 1966. Isolation of the *lac* repressor (*lac* 阻遏物的分离), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56:1891—1898.

Dickson, R., Abelson, J., Barnes, W., and Reznikoff, W., 1975. Genetic regulation: the *lac* control region. (遗传调节: *lac* 控制区), *Science* 187:27—35.

### 阿拉伯糖操纵子

Wilcox, G., Meuris, P., Bass, P., and Englesberg, E., 1974. Regulation of the arabinose operon in vitro (体外阿拉伯糖操纵子的调节), *J. Biol. Chem.* 249:2946—2952.

Hirsh, J., and Schleif, R., 1976. Electron microscopy of gene regulation: the L-arabinose operon (基因调节的电镜学: L-阿拉伯糖操纵子), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73:1518—1522.

### 色氨酸及组氨酸操纵子

Platt, T., 1978. Regulation of gene expression in the tryptophan operon of *Escherichia coli* (大肠杆菌色氨酸操纵子中基因表达的调控), In Miller, J. H., and Reznikoff, W. S., (eds.), *The Operon*, pp. 213—302. Cold Spring Harbor Laboratory. [一篇流畅的 *trp* 操纵子导论.]

Oxender, D. L., Zurawski, G., and Yanofsky, C., 1979. Attenuation in the *Escherichia coli* tryptophan operon: the role of RNA secondary structure involving the Trp codon region (大肠杆菌色氨酸操纵子的衰减: 涉及Trp密码子区的RNA二级结构的作用), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:5524—5528.

Bertrand, K., Korn, L., Lee, F., Platt, T., Squires, C. L., Squires, C., and Yanofsky, C., 1975. New features of the regulation of the tryptophan operon (色氨酸操纵子调节的新特征), *Science* 189:22—26. [说明发现了转录的衰减作用.]

Barnes, W. M., 1978. DNA sequence from the histidine operon control region: seven histidine codons in a row (组氨酸操纵子控制区的DNA顺序: 连续七个组氨酸密码子), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:4281—4285.

Stephens, J. C., Artz, S. W., and Ames, B. N., 1975. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino acid deficiency (鸟苷5'-二磷酸3'-二磷酸[ppGpp]: 组氨酸操纵子转录的正效应物和氨基酸缺乏的一般信号), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:4389—4393.

### 环腺苷一磷酸及分解代谢产物阻遏

Pastan, I., and Adhya, S., 1976. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli* (大肠杆菌中的3',5'-环腺苷一磷酸), *Bacteriol. Rev.* 40:527—551.

Zubay, G., Schwartz, D., and Beckwith, J., 1970. Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system (分解代谢产物敏感基因活化的机制: 一种正向控制系统), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66:104—110.

### 入噬菌体中转录的控制

Ptashne, M., Backman, K., Humayun, M. Z., Jeffrey, A., Maurer, R., Meyer, B., and Sauer, R. T., 1976. Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda ( $\lambda$  噬菌体中一个阻遏物的自动调节和功能), *Science* 194:156—161.

Johnson, A., Meyer, B. J., and Ptashne, M., 1978. Mechanism of action of the *cro* protein of bacteriophage  $\lambda$  ( $\lambda$  噬菌体中 *cro* 蛋白的作用机制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:1783—1787.

Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A. D., Maurer, R., Meyer, B. J., Pabo, C. O., Roberts, T. M., and Sauer, R. T., 1980. How the  $\lambda$  repressor and *cro* work ( $\lambda$  阻遏物和 *cro* 是如何工作的), *Cell* 19:1—11.

Hershey, A. D., (ed.), 1971. *The Bacteriophage Lambda*. Cold Spring Harbor Laboratory. [包括有关  $\lambda$  噬菌体的丰富知识.]

Reichardt, L., and Kaiser, A. D., 1971. Control of  $\lambda$  repressor synthesis ( $\lambda$  阻遏物合成的控制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:2185—2189.

## 第 29 章

### 入门读物

Crick, F., 1979. Split genes and RNA splicing (分隔基因及RNA拼接), *Science* 204:264—271.

DeRobertis, E. M., and Gurdon, J. B., 1979. Gene transplantation and the analysis of development (基因移植和发展分析), *Sci. Amer.* 241(6):74—82.

Beerman, W., and Clever, U., 1974. Chromosomal puffs (染色体的蓬松), *Sci. Amer.* 210(4):50—58.

Palade, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis (蛋白质合成过程中的细胞内问题), *Science* 189:347—358. [一篇通畅而富有知识性的诺贝尔奖金演讲.]

Rothman, J. E., and Lodish, H. F., 1979. The assembly of cell membranes (细胞膜装配), *Sci. Amer.* 240(1):48—63. [一篇优秀的关于膜不对称性的讨论.]

## 染色质

Cold Spring Harbor Symposia, 1978. *Chromatin*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 42.

McGhee, J. D., and Felsenfeld, G., 1980. Nucleosome structure (核小体结构), *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1115—1155.

Kornberg, R. D., 1977. Structure of chromatin (染色质的结构), *Ann. Rev. Biochem.* 46:931—954.

Kornberg, R. D., 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA (染色质结构: 组蛋白和DNA的重复单位), *Science* 184:868—871.

Sperling, R., and Wachtel, E. J., in press. The histones (组蛋白), *Advan. Protein Chem.*

## DNA复制

Kornberg, A., 1980. *DNA Replication*. Freeman. [第六章讲述真核生物DNA聚合酶及复制.]

DePamphilis, M. L., and Wassarman, P. M., 1980. Replication of eucaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork. (真核染色体的复制: 复制叉的特写), *Ann. Rev. Biochem.* 49:627—666.

Kriegstein, H. J., and Hogness, D. S., 1974. The mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality (果蝇染色体中DNA复制的机制: 复制叉的结构及其双向性的证据), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:135—139.

## 基因组的组织

Britten, R., and Kohn, D., 1968. Repeated segments of DNA (DNA的重复片段), *Sci. Amer.* 222(4):24—31.

Davidson, E. H., and Britten, R. J., 1979. Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences (基因表达的调控: 重复序列的可能作用), *Science* 204:1052—1059.

Long, E. O., and Dawid, I. B., 1980. Repeated genes in eucaryotes (真核细胞中的重复基因), *Ann. Rev. Biochem.* 49: 727—766.

Schimke, R. T., Kaufman, R. J., Alt, F. W., and Kellems, R. F., 1978. Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells (培养的鼠细胞的基因扩增及抗药性), *Science* 202:1051—1055.

Kedes, L. H., 1979. Histone genes and histone messengers(组蛋白基因及组蛋白信使), *Ann. Rev. Biochem.* 48:837—870.

Tzagoloff, A., Macino, G., and Sebald, W., 1979. Mitochondrial genes and translation products (线粒体基因和翻译产物), *Ann. Rev. Biochem.* 48:419—441.

## 分隔基因、转录及RNA加工

Darnell, J. E., Jr., 1979. Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses (真核细胞及其DNA病毒中产生mRNA的转录单位), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 22:327—353.

Abelson, J., 1979. RNA processing and the intervening sequence problem (RNA加工及间隔顺序

问题), *Ann. Rev. Biochem.* 48:1035—1069.

Royal, A., Garapin, A., Cami, B., Perrin, F., Mandel, J. L., LeMeur, M., Bregegegre, F., Gannon, F., LePennec, J. P., Chambon, P., and Kourilsky, P., 1979. The ovalbumin gene region: oviduct common features in the organisation of three genes expressed in chicken oviduct under hormonal control (卵清蛋白基因区: 在激素控制下, 小鸡输卵管表达的三种基因组织的共同特征), *Nature* 279:438—445.

DeRobertis, E. M., and Olson, M. V., 1979. Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes (酵母酪氨酸 tRNA 基因克隆经微注射进入蛙卵后的转录及加工), *Nature* 278:137—143.

Shatkin, A. J., 1976. Capping of eucaryotic mRNAs (真核细胞 mRNA 的戴帽), *Cell* 9:645—653.

### 翻译

Wool, I. G., 1979. Structure and function of eukaryotic ribosomes (真核细胞核糖体的结构和功能), *Ann. Rev. Biochem.* 48:719—754.

Revel, M., and Groner, Y., 1978. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes (真核细胞中基因表达的转录后及翻译水平的调控), *Ann. Rev. Biochem.* 47:1079—1126.

Pappenheimer, A. M., Jr., 1977. Diphtheria toxin (白喉毒素), *Ann. Rev. Biochem.* 46:69—94.

### 血红蛋白基因及地中海贫血

Weatherall, D. J., and Clegg, J. B., 1979. Recent developments in the molecular genetics of human hemoglobin (人血红蛋白分子遗传学的近年发展), *Cell* 12: 467—479.

Leder, A., Miller, H. I., Hamer, D. H., Seidman, J. G., Norman, B., Sullivan, M., and Leder, P., 1978. Comparison of cloned mouse  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin genes: conservation of intervening sequence locations and extra genic homology (克隆化小鼠  $\alpha$ -和  $\beta$ -珠蛋白基因的比较: 间隔顺序部位的保守性及基因外的相似性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:6187—6191.

Weatherall, D. J., 1978. The thalassemias (地中海贫血). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1508—1523. McGraw-Hill.

### 膜蛋白质及分泌性蛋白质的合成

Blobel, G., Walter, P., Chang, G. N., Goldman, B. M., Erickson, A. H., Lingappa, V. R., 1979. Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond (蛋白质的跨膜移位: 信号假说及更进一步设想), *Symp. Soc. Exp. Biol.* 33:9—36.

Unwin, P. N. T., 1977. Three-dimensional model of membrane-bound ribosomes obtained by electron microscopy (通过电镜术获得的膜结合核糖体的三维空间模型), *Nature* 269:118—122.

Rothman, J. E., and Lodish, H. F., 1977. Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein (新生膜蛋白质的同步化跨膜插入及糖化作用), *Nature* 269:775—780.

Waechter, C. J., and Lennartz, W. J., 1976. The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis (糖蛋白合成中聚戊醇结合糖基的作用), *Ann. Rev. Biochem.* 45:95—112.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S., 1976. Comparative aspects of glycoprotein structure (糖蛋白

结构的比较研究), *Ann. Rev. Biochem.* 45:217—237.

Robbins, P. W., Hubbard, S. C., Turco, S. J., and Wirth, D. F., 1977. Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins. (关于在膜糖蛋白合成中有一个共同寡糖中间物的建议), *Cell* 12:893—900.

Pearse, B. M. F., 1980. Coated vesicles (被膜小泡). *Trends Biochem. Sci.* 5:131—134.  
[关于包涵素的结构和功能的简明综述.]

Rothman, J. E., and Fine, R. E., 1980. Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages (被膜小泡以两个连续步骤将新合成的膜糖蛋白质从内质网转运至质膜), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77:780—784.

## 第 30 章

### 入门读物

Butler, P. J. G., and Klug, A., 1978. The assembly of a virus (病毒的装配), *Sci. Amer.* 239(5):62—69. [烟草花叶病毒装配方式.]

Bishop, J. M., 1980. The molecular biology of RNA tumor viruses: a physician's guide (RNA肿瘤病毒的分子生物学: 医生手册), *New Engl. J. Med.* 303:675—682.

Campbell, A. M., 1976. How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell (病毒怎样将其DNA插入宿主细胞DNA), *Sci. Amer.* 235(6):102—113.

Temin, H. M., 1972. RNA-directed DNA synthesis (RNA-指导的DNA合成), *Sci. Amer.* 226(1): 24—33.

Nathans, D., 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics (限制性内切核酸酶、猿病毒40和新遗传学), *Science* 206:903—909.

### 专著

Luria, S. E., Darnell, J. E., Jr., Baltimore, D., and Campbell, A., 1978. *General Virology* (3rd ed.). Wiley. [一本易读和有趣的病毒学专论.]

Tooze, J., (ed.), 1980. *The Molecular Biology of Tumour Viruses*. (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory.

Williams, R. C., and Fisher, H. W., 1974. *An Electron Micrographic Atlas of Viruses*. Thomas. [包括超群的电镜图及诱人的课文说明.]

### 病毒结构

Bloomer, A. C., Champness, J. N., Bricogne, G., Staden, R., and Klug, A., 1978. Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits (2.8 Å分辨率下见到的烟草花叶病毒蛋白质扁盘, 表明亚基内部及亚基间的相互作用), *Nature* 276:362—368.

Stubbs, G., Warren, S., and Holmes, K., 1977. Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-Å map calculated from X-ray fibre diagrams (由X射线纤维图象计算的4 Å图显示的烟草花叶病毒中的RNA及RNA结合部位的结构), *Nature* 267:216—221.

Harrison, S. C., Olson, A. J., Schutt, C. E., Winkler, F. K., and Bricogne, G., 1978. Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution (2.9 Å分辨率下的番茄丛缩病毒), *Nature* 276:368—373.

Harrison, S. C., 1978. Structure of simple viruses: specificity and flexibility in protein assemblies (简单病毒的结构: 蛋白质装配的特异性及灵活性), *Trends Biochem. Sci.* 3:3—6.

Crick, F. H. C., and Watson, J. D., 1957. Virus structure: general principles (病毒结构: 一般原理). In Wolstenholme, G. E. W., (ed.), *Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses*, pp. 5—13.

Caspar, D. L. D., and Klug, A., 1962. Physical principles in the construction of regular viruses (正规病毒结构的物理学原理), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:1—24. [在此经典文章中讨论了球形病毒结构的基本原理.]

## 病毒装配

Lebeurier, G., Nicolaieff, A., and Richards, K. E., 1977. Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus (烟草花叶病毒自我装配的内翻外模型), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:149—153.

Butler, P. J. G., Finch, J. T., and Zimmern, D., 1977. Configuration of tobacco mosaic virus RNA during virus assembly (病毒装配时烟草花叶病毒RNA的构型), *Nature* 265:217—219.

Wood, W. B., 1978. Bacteriophage T4 assembly and the morphogenesis of subcellular structures (T4噬菌体的装配和亚细胞结构的形态形成), *Harvey Lectures* 73:203—223.

Casjens, S., and King, J., 1975. Virus assembly (病毒装配), *Ann. Rev. Biochem.* 44:555—611.

## 限制和修饰

Smith, D. H., 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases (限制性核酸内切酶的核苷酸顺序特异性), *Science* 205:455—462.

Arber, W., 1979. Promotion and limitation of genetic exchange (遗传交换的促进和限制), *Science* 205:361—365.

## 干扰素

Friedman, R. M., 1977. Antiviral activity of interferon (干扰素的抗病毒活性), *Bacteriol. Rev.* 41:543—567.

Farrell, P. J., Sen, G. C., Dubois, M. F., Ratner, L., Slattey, E., and Lengyel, P., 1978. Interferon action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA (干扰素的作用: 双链RNA对蛋白质合成抑制的两条不同途径), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:5893—5897.

Burke, D. C., 1977. The status of interferon (干扰素的现状), *Sci. Amer.* 236(4):42—50.

## Q $\beta$ RNA的细胞外进化

Mills, D. R., Peterson, R. L., and Spiegelman, S., 1967. An extracellular Darwinian experiment with a selfduplicating nucleic acid molecule(用自我复制的核酸分子进行的细胞外达尔文实验), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58:217—224.

## 溶原现象

Lwoff, A., 1966. The prophage and I (我与原噬菌体). In Cairns, J., Stent, G. S., and Watson, J. D., (eds.), *Phage and the Origins of Molecular Biology*, pp. 88—99. Cold Spring Harbor Laboratory. [一篇关于发现溶原性依据的可喜描述.]

## 肿瘤病毒

Baltimore, D., 1976. Viruses, polymerases, and cancer(病毒、聚合酶和癌症), *Science*192:632—636.

Temin, H., 1976. The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis (DNA 前病毒假设: RNA 指导的 DNA 合成学说的建立和意义), *Science* 192:1075—1080.

Dulbecco, R., 1976. From the molecular biology of oncogenic DNA viruses to cancer (从致癌DNA病毒的分子生物学到癌症), *Science* 192:437—440.

Bishop, J. M., 1978. Retroviruses (反转病毒), *Ann. Rev. Biochem.* 47:35—88.

Reddy, V. B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K. N., Zain, B. S., Pan, J., Ghosh, P. K., Celma, M. L., and Weissman, S. M., 1978. The genome of simian virus 40 (猿病毒40的基因组), *Science* 200:494—502.

## 第 31 章

### 入门读物

Gilbert, W., and Villa-Komaroff, L., 1980. Useful proteins from recombinant bacteria (从重组细菌中获得的有用蛋白质), *Sci. Amer.* 242(4):74—94.

Cohen, S. N., and Shapiro, J. A., 1980. Transposable genetic elements (可易位的遗传元件), *Sci. Amer.* 242(2):40—49.

Abelson, J., and Butz, E., (eds.), 1980. Recombinant DNA (重组 DNA), *Science*209:1317—1438. [此期高度知识性的 *Science* 内容包括许多关于真核基因的结构和运动以及克隆化基因的表达的优秀文章.]

Clowes, R. C., 1973. The molecule of infectious drug resistance (传染性抗药性分子), *Sci. Amer.* 228(4):18—27.

Cohen, S. N., 1975. The manipulation of genes (基因操纵), *Sci. Amer.* 233(1):24—33. [此篇以及其他有趣的文章复印于 D. Freifelder, (ed.), *Recombinant DNA* (Freeman, 1978).]

Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., and Ingraham, J. L., 1976. *The Microbial World* (4th ed.). Prentice-Hall.[第十五章关于重组,接合和传导,是突出的一章.]

### 基因重组

Stahl, F. W., 1979. *Genetic Recombination*. Freeman.

Potter, H., and Dressler, D., 1978. In vitro system from *Escherichia coli* that catalyzes generalized genetic recombination (能催化产生基因重组的大肠杆菌体外系统), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:3698—3702.

McEntee, K., Weinstock, G. M., and Lehman, I. R., 1979. Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the recA protein of *E. coli* (体外大肠杆菌 recA 蛋白催化的普通重组的开始), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:2615—2619.

Cunningham, R. P., Shibata, T., DasGupta, C., and Radding, C. M., 1979. Single strands induce recA protein to unwind duplex DNA for homologous pairing (单链能诱导 recA 蛋白使 DNA 双链解链,以进行同源性配对), *Nature* 281:191—195.

Radding, C. M., 1978. Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair (基



因重组: 链的转移和错配的修复), *Ann. Rev. Biochem.* 47:847—880.

### 可易位的遗传元件

Calos, M. P., and Miller, J. H., 1980. Transposable elements (可易位元件), *Cell* 20:579—595.

Cohen, S. N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution (可易位遗传元件及质粒进化), *Nature* 263:731—738.

Kleckner, N., 1977. Translocatable elements in procaryotes (原核细胞中的可易位元件), *Cell* 11:11—23.

Hicks, J., Strathern, J. N., and Klar, A.J.S., 1979. Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae* (酵母菌中可易位配偶型基因), *Nature* 282:478—483.

Gill, R. E., Heffron, F., and Falkow, S., 1979. Identification of the protein encoded by the transposable element Tn3 which is required for its transposition (由可易位元件 Tn3 编码的蛋白质的鉴别, 后者是 Tn3 易位所需), *Nature* 282:797—801.

Chou, J., Lemaux, P. G., Casadaban, M. J., and Cohen, S. N., 1979. Transposition protein of Tn3: identification and characterisation of an essential repressor-controlled gene product (Tn3 的易位蛋白: 一个必要的阻遏物控制的基因产物的鉴别和鉴定), *Nature* 282:801—806.

Bukhari, A. I., Shapiro, J. A., and Adhya, S. L., (eds.), 1977. *DNA Insertion Elements and Episomes*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Broda, P., 1979. *Plasmids*. Freeman.

### 重组基因的建造及克隆

Setlow, J. K., and Hollaender, A., (eds.), 1979. *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Plenum.

Scott, W. A., and Werner, R., 1977. *Molecular Cloning of Recombinant DNA*. Academic Press.

Helinski, D. R., 1978. Plasmids as vehicles for gene cloning: impact on basic and applied research(质粒作为基因克隆的载体: 对基础研究和应用研究的冲击), *Trends Biochem. Sci.* 3:10—14.

Cameron, J. R., Panesenko, S. M., Lehman, I. R., and Davis, R. W., 1975. In vivo construction of bacteriophage  $\lambda$  carrying segments of the *Escherichia coli* chromosome: selection of hybrids containing the gene for DNA ligase (体内建造携带大肠杆菌染色体片段的  $\lambda$  噬菌体: 含有 DNA 连接酶基因的杂交体的选择), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:3416—3420.

Collins, J., and Hohn, B., 1978. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage heads (科斯质粒: 一类在体外可包装进入噬菌体头部的质粒基因-克隆载体), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:4242—4246.

Maniatis, T., Hardison, R. C., Lacy, E., Lauer, J. O'Connell, C., Quon, D., Sim, G. K., and Efstratiadis, A., 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA (从真核细胞 DNA 文库中分离结构基因), *Cell* 15:687—701.

### 克隆基因的表达

Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S. P., Chick, W. L. and Gilbert, W., 1978. A bacterial clone synthesizing proinsulin (合成胰岛素原的一个细菌克隆), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:3727—3731.

Burrell, C. J., Mackory, P., Greenaway, P. J., Hofschneider, P. H., and Murray, K., 1979. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322 (从质粒 pBR322 中克隆获得的肝炎 B 病毒 DNA 序列在大肠杆菌中的表达), *Nature* 279:43—47.

Mulligan, R. C., Howard, B. H., and Berg, P., 1979. Synthesis of rabbit  $\beta$ -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40  $\beta$ -globin recombinant genome (用 SV40 $\beta$ -珠蛋白重组基因组感染后培养的猴肾细胞兔  $\beta$ -珠蛋白的合成), *Nature* 277:108—114.

### 基因的化学合成

Khorana, H. G., 1979. Total synthesis of a gene. (一个基因的全合成), *Science* 203:614—625.

Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., and Boyer, H. W., 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin (化学合成的激素——生长激素释放抑制因子的基因在大肠杆菌中的表达), *Science* 198:1056—1063.

Crea, R., Kraszewski, A., Hirose, T., and Itakura, K., 1978. Chemical synthesis of genes for human insulin. (人胰岛素基因的化学合成), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:5765—5769.

## 第 32 章

### 入门读物

Nikaido, H., and Nakae, T., 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria (革兰氏阴性细菌的外膜), *Advan. Microbiol. Physiol.* 14: 163—250.

DiRienzo, J. M., Nakamura, K., and Inouye, M., 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions (革兰氏阴性细菌的外膜蛋白: 生物合成、组装和功能), *Ann. Rev. Biochem.* 47:481—532.

Sharon, N., 1969. The bacterial cell wall (细菌细胞壁), *Sci. Amer.* 220(5):92—98.

### 细菌细胞被膜

Leive, L., (ed.), 1973. *Bacterial Membranes and Walls*. Marcel Dekker. [这是一本汇集关键性综述文章的很好的合订本, 其中, M. M. Ghuyssen 和 G. D. Shockman 关于肽聚糖生物合成的文章及 H. Nikaido 关于革兰氏阴性细菌的细胞被膜的生物合成的文章与本章内容特别贴切.]

Nikaido, H., 1979. Permeability of the outer membrane of bacteria (细菌外膜的通透性), *Angew. Chem. (Int. Ed.)* 18:337—350.

Hussey, H., and Baddiley, J., 1976. Biosynthesis of bacterial cell walls (细菌细胞壁的生物合成). In Martonosi, A., (ed.), *The Enzymes of Biological Membranes*, vol. 2, pp. 227—326. Plenum.

Osborn, M. J., 1971. The role of membranes in the synthesis of macromolecules (在大分子合成中膜的作用), In Rothfield, L. I., (ed.), *Structure and Function of Biological Membranes*, pp. 343—400. Academic Press.

Steven, A. C., ten Heggeler, B., Müller, R., Kistler, J., and Rosenbusch, J. P., 1977. Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli* (大肠杆菌外膜上的周期蛋白层的超结构), *J. Cell. Biol.* 72: 292—301.

### 青霉素和杆菌肽

Fleming, A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special

reference to their use in the isolation of *B. influenzae* (青霉素培养物的抗菌作用, 特别是关于它们应用于流感菌的分离中), *Brit. J. Exp. Pathol.* 10:226—236.

Chain, E., 1971. Thirty years of penicillin therapy (青霉素疗法三十年), *Proc. Roy. Soc. London (B)* 179:293—319.

Strominger, J. L., Blumberg, P. M., Suganaka, H., Umbreit, J., and Wickus, G. G., 1971. How penicillin kills bacteria: progress and problems (青霉素是如何杀死细菌的: 进展与问题), *Proc. Roy. Soc. London (B)* 179:369—383.

Yocum, R. R., Waxman, D. J., Rasmussen, J. R., and Strominger, J. L., 1979. Mechanisms of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases (青霉素的作用机制: 青霉素与底物共价结合于两种细菌的D-丙氨酸羧肽酶的相同的丝氨酸活性部位上), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:2730—2734.

Stone, K. J., and Strominger, J. L., 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and  $C_{55}$ -isoprenyl pyrophosphate (杆菌肽的作用机制: 与金属离子及 $C_{55}$ -异戊二烯焦磷酸的络合), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:3223—3227.

Boyd, D. B., 1977. Transition state structures of a dipeptide related to the mode of action of  $\beta$ -lactam antibiotics (与 $\beta$ -内酰胺抗菌素的作用模式有关的一种二肽的过渡态结构), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5239—5243.

#### 信号顺序和蛋白质定位

Chang, C. N., Model, P., and Blobel, G., 1979. Membrane biogenesis: cotranslational integration of the bacteriophage f1 coat protein into an *Escherichia coli* membrane fraction(膜的生物发生: 噬菌体 f1 外壳蛋白共同转移整合成大肠杆菌膜组分), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:4891—4895.

Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halejouda, S., and Inouye, M., 1977. Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane (大肠杆菌外膜的脂蛋白原的肽延伸段的氨基酸顺序), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:1004—1008.

Bedouelle, H., Bassford, P. J., Jr., Fowler, A. V., Zabin, I., Beckwith, J., and Hofnung, M., 1980. Mutations which alter the function of the signal sequence of the maltose binding protein of *Escherichia coli* (改变大肠杆菌的麦芽糖结合蛋白的信号顺序功能的突变), *Nature* 285:78—81.

Emr, S., Hedgpeth, J., Clement, J. -M., Silhavy, T. J., and Hofnung, M., 1980. Sequence analysis of mutations that prevent export of  $\lambda$  receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein (阻止大肠杆菌的一种外膜蛋白—— $\lambda$  受体——排出的突变的顺序分析), *Nature* 285:82—91.

Bassford, P., and Beckwith, J., 1979. *Escherichia coli* mutants accumulating the precursor of a secreted protein in the cytoplasm (在细胞质中积聚一种分泌性蛋白质前体的大肠杆菌变种), *Nature* 277:538—541.

Emr, S. D., Schwartz, M. and Silhavy, T. J., 1978. Mutations altering the cellular localization of the phage  $\lambda$  receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein (改变一种大肠杆菌外膜蛋白 $\lambda$ 噬菌体受体的细胞定位的突变), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:5802—5806.

Lin, J. J. C., Kanazawa, H., Ozols, J., and Wu, H. C., 1978. An *Escherichia coli* mutant with an amino acid alteration within the signal sequence of outer membrane prolipoprotein. (一种在外膜脂蛋白原的信号顺序中的氨基酸发生改变的大肠杆菌突变种), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:4891—4895.

## 第 33 章

### 入门读物

- Capra, J. D., and Edmundson, A. B., 1977. The antibody combining site (抗体结合部位), *Sci. Amer.* 236 (1): 50—59.
- Milstein, C., 1980. Monoclonal antibodies (单克隆抗体), *Sci. Amer.* 243(4):66—74.
- Porter, R. R., 1973. Structural studies of immunoglobulins (免疫球蛋白结构的研究), *Science* 180:713—716.
- Edelman, G. M., 1973. Antibody structure and molecular immunology (抗体结构和分子免疫学), *Science* 180:830—840.

### 专著

- Hood, L. E., Weissman, I. L., and Wood, W. B., 1978. *Immunology*. Benjamin. [一本明确易懂的免疫学导论.]
- Kabat, E. A., 1976. *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*, (2nd ed.), Holt, Rinehart, and Winston. [是一本有关免疫球蛋白结构及其与抗原结合特异性关系的杰出著作.]
- Mishell, B. B., and Shiigi, S. M., (eds.), 1980. *Selected Methods in Cellular Immunology*. Freeman. [一本在免疫学实验过程中很有用的指南.]

### 免疫球蛋白结构

- Amzel, L. M., and Poljak, R. J., 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins (免疫球蛋白的三维结构), *Ann. Rev. Biochem.* 48:961—967.
- Silverton, E. W., Navia, M. A., and Davies, D. R., 1977. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin (完整的人免疫球蛋白的三维结构), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5140—5144.
- Valentine, R. C., and Green, N. M., 1967. Electron microscopy of an antibody-hapten complex (抗体-半抗原复合物的电子显微学), *J. Mol. Biol.* 27:615—617.

### 基因构造

- Tonegawa, S., Maxam, A. M., Tizard, R., Bernard, O., and Gilbert, W., 1978. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain (免疫球蛋白轻链可变区的小鼠胚系基因的顺序), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:1485—1489.
- Sakano, H., Rogers, J. H., Hüppi, K., Brack, C., Traunecker, A., Maki, R., Wall, R., and Tonegawa, S., 1979. Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments (免疫球蛋白重链的每个结构域和铰链区由分开的 DNA 片段编码), *Nature* 277:627—633.

### 多样性的产生

- Seidman, J. G., Leder, A., Nau, M., Norman, B., and Leder, P., 1978. Antibody diversity (抗体多样性), *Science* 202:11—17.
- Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G., and Tonegawa, S., 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes (免疫球蛋白轻链基因的体细胞重组部位

的顺序), *Nature* 280:288—294.

Seidman, J. G., Max, E. E., and Leder, P., 1979. A  $\kappa$ -immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation (由特异位置的重组, 但没有进一步的体细胞突变, 形成一个  $\kappa$ -免疫球蛋白基因), *Nature* 280:370—375.

Schilling, J., Clevinger, B., Davie, J. M., and Hood, L., 1980. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments (均一的葡聚糖抗体的氨基酸顺序和重链 V 区基因片段的 DNA 重排), *Nature* 283:35—40.

Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N., and Honjo, T., 1980. Rearrangement of immunoglobulin  $\gamma$ 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch (免疫球蛋白的  $\gamma$ 1-链基因的重排和重链类启换的机制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 919—923.

Davis, M. M., Calame, K., Early, P. W., Livant, D. L., Joho, R., Weissman, I. L., and Hood, L., 1980. An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events (至少发生两次重组事件才能形成一个免疫球蛋白重链基因), *Nature* 283:733—739.

### 免疫球蛋白的效应物功能

Porter, R. R., and Reid, K. B. M., 1978. The biochemistry of complement (补体的生物化学), *Nature* 275:699—704.

Metzger, H., 1978. The IgE-mast cell system as a paradigm for the study of antibody mechanisms. (IgE-巨细胞系统作为研究抗体机制的一个范例), *Immunol. Rev.* 41: 186—199.

### 克隆选择和细胞免疫学

Burnet, F. M., 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge University Press.

Jerne, N. K., 1967. Antibodies and learning: selection versus instruction (获得性免疫性的克隆选择理论), In Quarton, G. C., Melnechuk, T., and Schmitt, F. O., (eds.), *The Neurosciences: A Study Program*. Rockefeller University Press.

Cunningham, B. A., 1977. The structure and function of histocompatibility antigens (组织相容性抗原的结构与功能), *Sci. Amer.* 237(4):96—107.

Raff, M. C., 1976. Cell-surface immunology (细胞表面免疫学), *Sci. Amer.* 234(5):30—39.

Jerne, N. K., 1973. The immune system (免疫系统), *Sci. Amer.* 229(1):52—60.

## 第 34 章

### 入门读物

Huxley, H. E., 1965. The mechanism of muscular contraction (肌肉收缩的机制), *Sci. Amer.* 213(6):18—27.

Cohen, C., 1975. The protein switch of muscle contraction (肌肉收缩的蛋白质开关), *Sci. Amer.* 233(5):36—45.

Murray, J. M., and Weber, A., 1974. The cooperative action of muscle proteins (肌肉蛋白的协同作用), *Sci. Amer.* 230(2):59—69.

Lazarides, E., and Revel, J. P., 1979. The molecular basis of cell movement (细胞运动的分子基础), *Sci. Amer.* 240(5):100—113.

Satir, P., 1974. How cilia move (纤毛是如何运动的), *Sci. Amer.* 231(4):44—52.

Dustin, P., 1980. Microtubules (微管), *Sci. Amer.* 243(2):66—76.

## 专著

Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. *The Mechanism of Muscle Contraction* (Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 37). [一系列杰出文章的汇编, 内容包括肌肉蛋白质的结构、收缩力的产生、调控系统、肌质网、肌发生和非肌肉组织中的收缩蛋白.]

Goldman, R., Pollard, T., and Rosenbaum, J., (eds.), 1976. *Cell Motility*. Cold Spring Harbor Laboratory. [包括很多篇优秀的文章, 内容有微丝和微管以及它们在细胞游动中的作用.]

Inoue, S., and Stephens, R. E., (eds.), 1975. *Molecules and Cell Movement*. Raven Press.

Hatano, S., Ishikawa, H., and Sato, H., (eds.), 1979. *Cell Motility: Molecules and Organization*. University Park Press.

Sugi, H., and Pollack, G. H., (eds.), 1979. *Cross-bridge Mechanism in Muscle Contraction*. University Park Press.

## 肌肉收缩

Huxley, H. E., 1971. The structural basis of muscle contraction. (肌肉收缩的结构基础), *Proc. Roy. Soc. London (B)* 178:131—149.

Huxley, A. F., 1975. The origin of force in skeletal muscle (骨骼肌中力的起源), *Ciba Found. Symp.* 31:271—290.

Harrington, W. F., 1979. Contractile proteins of muscle (肌肉的收缩蛋白质), *In* Neurath, H., and Hill, R. L., (eds.), *The Proteins* (3rd ed.), vol. 4, pp. 245—409. Academic Press.

Adelstein, R. S., and Eisenberg, E., 1980. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction (肌动蛋白-肌球蛋白-ATP 相互作用的调控和动力学), *Ann. Rev. Biochem.* 49:921—956.

Hill, T. L., 1977. *Free Energy Transduction in Biology*. Academic Press. [第五章透彻地讨论了肌肉收缩的热力学.]

Huxley, H. E., Farugi, A. R., Bordas, J., Koch, M. H. J., and Milch, J. R., 1980. The use of synchrotron radiation in time-resolved x-ray diffraction studies of myosin layer-line reflections during muscle contraction (肌肉收缩时肌球蛋白层线反射的时间分辨 x 射线衍射研究中同步辐射的应用), *Nature* 284:140—143.

Adelstein, R. S., (ed.), 1980. Symposium on phosphorylation of muscle contractile proteins (有关肌肉收缩蛋白的磷酸化作用论文集), *Fed. Proc.* 39:1544—1573.

McCubbin, W. D., and Kay, C. M., 1980. Calcium-induced conformational changes in the troponin-tropomyosin complexes of skeletal and cardiac muscle and their roles in the regulation of contraction-relaxation (在骨骼肌和心肌的肌钙蛋白-原肌球蛋白复合物中钙诱导的构象变化以及它们在收缩与松弛调控中的作用), *Acc. Chem. Res.* 13: 185—192.

## 细胞游动性中的肌动蛋白和肌球蛋白

Korn, E. D., 1978. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review) (肌动球蛋白依赖性细胞游动性的生物化学[综述]), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:588—599.

Clarke, M., and Spudich, J. A., 1977. Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination (非肌肉收缩蛋白质: 细胞游动性与形状确定中肌动蛋白和肌球蛋白的作用), *Ann. Rev. Biochem.* 46:797—822.

Tilney, L. G., 1979. Actin, motility, and membranes (肌动蛋白、游动性和膜). *In* Cone, R.

A., and Dowling, J. E., (eds.), *Membrane Transduction Mechanisms*, pp. 163—186. Raven Press.

Lin, S., Lin, D. C., and Flanagan, M. D., 1978. Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes (在运输和游动过程中细胞松弛素 B 作用的特异性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:329—333.

Brown, S. S., and Spudich, J. A., 1979. Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments (细胞松弛素抑制肌动蛋白纤维片段伸长的速率), *J. Cell Biol.* 83:657—662.

## 微管

Kirschner, M. W., 1978. Microtubules: assembly and nucleation (微管: 装配和成核现象), *Int. Rev. Cytol.* 54:1—71.

Margolis, R. L., and Wilson, L., 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro (体外稳态下微管相对端的装配和解离), *Cell* 13:1—8.

Amos, L. A., and Baker, T. S., 1979. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments (微管蛋白原丝状体的三维结构), *Nature* 279:607—612.

Summers, K. E., and Gibbons, I. R., 1971. ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of seaurchin sperm (经胰蛋白酶处理的海胆精子鞭毛中的 ATP 诱导小管滑动), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:3092—3096. [这些独创性实验揭示出正常鞭毛的弯曲波动是 ATP 诱导的相邻双体微管之间的剪力造成的.]

Haimo, L. T., Telzer, B. R., and Rosenbaum, J. L., 1979. Dynein binds to and crossbridges cytoplasmic microtubules (动蛋白结合于并横跨胞质微管), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:5759—5763.

Sturgess, J. M., Chao, J., Wong, J., Aspin, N., and Turner, J. A. P., 1979. Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease (径向辐条有缺陷的纤毛: 引起人的呼吸道疾病的一个原因), *New Engl. J. Med.* 300:53—56.

## 中间丝

Lazarides, E., 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space (中间丝作为细胞空间的机械整合物), *Nature* 283:249—256.

# 第 35 章

## 入门读物

Pastan, I., 1972. Cyclic AMP (环 AMP), *Sci. Amer.* 227(2):97—105.

Rubenstein, E., 1980. Diseases caused by impaired communication among cells (破坏细胞间的通讯而引起的疾病), *Sci. Amer.* 242(3):102—121.

Sutherland, E. W., 1972. Studies on the mechanism of hormone action (激素作用机制的研究), *Science* 177:401—408.

Snyder, S. H., 1977. Opiate receptors and internal opiates (鸦片剂受体和内源鸦片剂), *Sci. Amer.* 236(3):44—56.

Guillemin, R., 1978. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron (脑内的肽: 新的神经元内分泌学), *Science* 202:390—402.

## 激素受体

Baxter, J. D., and MacLeod, K. M., 1980. Molecular basis for hormone action (激素作

用的分子基础)。In Bondy, P. K., and Rosenberg, L. E., (eds.), *Metabolic Control and Disease*, pp. 104—160. Saunders.

Bradshaw, R. A., and Frazier, W. A., 1977. Hormone receptors as regulators of hormone action (激素受体是激素作用的调节因子), *Curr. Top. Cell Regul.* 12:1—35.

Kahn, C. R., 1976. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters (激素和神经介质的膜受体), *J. Cell Biol.* 70:261—286.

Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W., and Brown, M. S., 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis (被膜小坑、被膜小泡及受体介导的内摄作用), *Nature* 279:679—685.

### 环 AMP 和腺苷酸环化酶

Ross, E. M., and Gilman, A. G., 1980. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase (激素敏感的腺苷酸环化酶的生物化学性质), *Ann. Rev. Biochem.* 49:533—564.

Rodbell, M., 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction (激素受体和 GTP 调节蛋白在膜传导中的功能), *Nature* 284:17—22.

Helmreich, E. J. M., Zenner, H. P., Pfeuffer, T., and Cori, C. F., 1976. Signal transfer from hormone receptor to adenylate cyclase (从激素受体到腺苷酸环化酶的信号传递), *Curr. Top. Cell Regul.* 10:41—87.

Greengard, P., 1978. Phosphorylated proteins as physiological effectors (磷酸化的蛋白质是生理效应物), *Science* 199:146—152.

Means, A. R., and Dedham, J. R., 1980. Calmodulin: an intracellular calcium receptor (钙调节蛋白: 细胞内的一种钙受体), *Nature* 285:73—77.

### 霍乱毒素

Moss, J., and Vaughan, M., 1979. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin (霍乱肠菌素激活腺苷酸环化酶), *Ann. Rev. Biochem.* 48:581—600.

Hirschorn, N., and Greenough, W. B., III, 1971. Cholera (霍乱), *Sci. Amer.* 225(2):15—21.

### 胰岛素与糖尿病

Czech, M. P., 1977. Molecular basis of insulin action (胰岛素作用的分子基础), *Ann. Rev. Biochem.* 46:359—384.

Steiner, D. F., 1977. Insulin today (今日胰岛素), *Diabetes* 26:322—340.

Renold, A. E., Mintz, D. H., Muller, W. A., and Cahill, G. F., Jr., 1978. Diabetes mellitus (糖尿病). In Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., and Fredrickson, D. S., (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), McGraw-Hill.

Tager, H., Given, B., Baldwin, D., Mako, M., Markese, J., Rubenstein, A., Olefsky, J., Kobayashi, M., Kolterman, O., and Poucher, R., 1979. A structurally abnormal insulin causing human diabetes (结构异常的胰岛素引起人类糖尿病), *Nature* 281:122—125.

### 内啡肽和鸦片制剂

Guillemin, R., 1977. Endorphins: brain peptides that act like opiates (内啡肽: 起鸦片剂作用的脑肽), *New Engl. J. Med.* 296:226—228.

Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A. C. Y., Cohen, S. N., and



Numa, S., 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor (牛促肾皮质激素- $\beta$ -促脂肪酸释放激素前体的克隆的 cDNA 的核苷酸顺序), *Nature* 278:423—427.

Snyder, S. H., 1977. Opiate receptors in the brain (脑内鸦片剂的受体), *New Engl. J. Med.* 296:266—271.

### 生长因子

Haigler, H. T., and Cohen, S., 1979. Epidermal growth factor: interactions with cellular receptors (表皮生长因子: 与细胞受体的相互作用), *Trends Biochem. Sci.* 4:132—134.

Greene, L. A., and Shooter, E. M., 1980. The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action (神经生长因子: 生物化学、合成和作用机制), *Ann. Rev. Neurosci.* 3:353—402.

Levi-Montalcini, R., and Calissano, P., 1979. The nerve-growth factor (神经生长因子), *Sci. Amer.* 240(6):68—77.

### 类固醇激素和维生素 D

Yamamoto, K. R., and Alberts, B. M., 1976. Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription (类固醇受体: 调制真核生物转录作用的要素), *Ann. Rev. Biochem.* 45:721—746.

DeLuca, H. F., 1974. Vitamin D: the vitamin and the hormone (维生素 D: 维生素和激素), *Fed. Proc.* 33:2211—2219.

Haussler, M. R., and McCain, T. A., 1977. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (与维生素 D 代谢和作用有关的基本概念以及临床概念), *New Engl. J. Med.* 297: 974—984; 1041—1049.

### 前列腺素

Samuelsson, B., Granstrom, E., Green, K., Hamberg, M., and Hammarstrom, S., 1975. Prostaglandins (前列腺素), *Ann. Rev. Biochem.* 44:669—695.

Roth, G. J., and Siok, C. J., 1978. Acetylation of the NH<sub>2</sub>-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin (阿司匹林使前列腺素合成酶的氨-末端丝氨酸乙酰化), *J. Biol. Chem.* 253:3782—3784.

Vane, J. R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs (类阿司匹林药物的一个作用机制是抑制前列腺素合成), *Nat. New Biol.* 231:232—235.

### 激素的放射免疫测定

Yalow, R. S., 1978. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems (放射免疫测定: 生物系统精细结构的探针), *Science* 200:1236—1246.

### 习题集

Hood, L. E., Wilson, J. H., and Wood, W. B., 1975. *Molecular Biology of Eucaryotic Cells*, ch. 6. Benjamin.

## 第 36 章

### 入门读物

Hobbs, A. S., and Albers, R. W., 1980. The structure of proteins involved in active membrane transport (主动膜运输中有关的蛋白质结构), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:259—291.

Wilson, D. B., 1978. Cellular transport mechanisms (细胞的运输机制), *Ann. Rev. Biochem.* 47:933—965.

Harold, F. M., 1978. Vectorial metabolism (传病媒介的新陈代谢). In Ornston, L. N., and Sokatch, J. R., (eds.), *The Bacteria*, vol. 6, pp. 463—521. Academic Press.

Saier, M. H., Jr., 1979. The role of the cell surface in regulating the internal environment (细胞表面在调节内部环境中的作用). In Sokatch, J. R., and Ornston, L. N., (eds.), *The Bacteria*, vol. 7, pp. 167—227, Academic Press.

Estes, J. W., and White, P. D., 1965. William Withering and the purple foxglove (威瑟林, W. 和紫色毛地黄), *Sci. Amer.* 212(6):110—117. [有关毛地黄的一个有趣的历史回顾.]

### 专著

Andreoli, T. E., Hoffman, J. F., and Fanestil, D. D., (eds.), 1978. *Physiology of Membrane Disorders*. Plenum. [包含膜运输诸方面的极好文章.]

Rosen, B. P., (ed.), 1978. *Bacterial Transport*. Dekker.

### Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 离子的运输

Skou, J. C., and Norby, J. G., (eds.), 1979. *Na, K-ATPase: Structure and Kinetics*. Academic Press.

Fishman, M. C., 1979. Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain (哺乳动物脑中内源性类毛地黄的活性), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:4661—4663.

Sweadner, K. J., and Goldin, S. M., 1980. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation (钠和钾离子的主动运输: 机制、功能和调节), *New Engl. J. Med.* 302:777—783.

Cantley, L. C., Jr., Resh, M. D., and Guidotti, G., 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the cytoplasmic side (钒酸盐从胞质一侧抑制红细胞 [Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>]-ATP 酶), *Nature* 272:552—554.

Akera, T., 1977. Membrane adenosine triphosphatase: a digitalis receptor? (膜腺苷三磷酸酶: 一种毛地黄受体?), *Science* 198:569—574. [证明 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP 酶是毛地黄药理学效应的靶的评论.]

Jardetzky, O., 1966. Simple allosteric model for membrane pumps (膜泵的简单变构模型), *Nature* 211:969.

### 钙离子的运输

deMeis, L., and Vianna, A. L., 1979. Energy interconversion by the Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum (肌浆网中 Ca<sup>2+</sup> 依赖的 ATP 酶进行的能量互变), *Ann. Rev. Biochem.* 48:275—292.

MacLennan, D. H., and Campbell, K. P., 1979. Structure, function, and biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins (肌浆网蛋白质的结构、功能和生物合成), *Trends Biochem. Sci.*

4:148—151.

Tada, M., Yamamoto, T., and Tonomura, Y., 1978. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum (肌浆网中钙主动运输的分子机制), *Physiol. Rev.* 58:1—79.

Racker, E., 1972. Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified  $\text{Ca}^{2+}$ -adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum (用磷脂和一个从肌浆网中纯化的  $\text{Ca}^{2+}$ -腺苷三磷酸酶重建钙泵), *J. Biol. Chem.* 247:8198—8200.

Wasserman, R. H., Fullmer, C. S., and Taylor, A. N., 1978. The vitamin D-dependent calcium binding proteins (维生素D依赖的结合钙的蛋白质), In Lawson, D. E. M., (ed.), *Vitamin D*, Academic Press.

Kretsinger, R. H., 1976. Calcium-binding proteins (结合钙的蛋白质), *Ann. Rev. Biochem.* 45:239—266.

### 细菌运输系统

Kaback, H. R., Ramos, S., Robertson, D. E., Stroobant, P., and Tokuda, H., 1977. Energetics and molecular biology of active transport in bacterial membrane vesicles. (细菌膜泡中主动运输的力能学和分子生物学), *J. Supramol. Struct.* 7:443—461.

Saier, M. H., Jr., 1977. Bacterial phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships (细菌的磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统: 结构、功能和进化的相互关系), *Bacteriol. Rev.* 41:856—871.

Simoni, R. D., and Postma, P. W., 1975. The energetics of bacterial active transport (细菌的主动运输的力能学), *Ann. Rev. Biochem.* 44:523—554.

### 细胞间通道

Loewenstein, W. R., Kanno, Y., and Socolar, S. J., 1978. The cell-to-cell channel (细胞-细胞间通道), *Fed. Proc.* 37:2645—2650.

Unwin, P. N. T., and Zampighi, G., 1980. Structure of the junction between communicating cells (通讯细胞间接头的结构), *Nature* 283:545—549.

Hertzberg, E. L., and Gilula, N. B., 1979. Isolation and characterization of gap junctions from rat liver (大鼠肝脏中间隙接头的分离及其表征), *J. Biol. Chem.* 254:2138—2147.

Staehelin, L. A., and Hull, B. E., 1978. Junctions between living cells (活细胞间的接头), *Sci. Amer.* 238(5):140—152.

### 运输抗菌素

Urban, B. W., Hladky, S. B., and Haydon, D. A., 1978. The kinetics of ion movements in the gramicidin channel (在短杆菌肽通道中离子运动的动力学), *Fed. Proc.* 37:2628—2632.

Ovchinnikov, Y. A., 1979. Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels (离子穿越生物膜的物理-化学基础: 离子载体和离子通道), *Eur. J. Biochem.* 94:321—336.

Laüger, P., 1972. Carrier-mediated ion transport (载体介导的离子运输), *Science* 178:24—30.

Krasne, S., Eisenman, G., and Szabo, G., 1971. Freezing and melting of lipid bilayers and the mode of action of nonactin, valinomycin, and gramicidin (脂类双层膜的冻结和熔解以及无活菌素、缬氨霉素和短杆菌肽的作用方式), *Science* 174:412—415.

Koepppe, R. E., Berg, J. M., Hodgson, K. O., and Stryer, L., 1979. Gramicidin A crystals

contain two cation binding sites per channel (短杆菌肽 A 晶体每个通道含有两个阳离子结合部位), *Nature* 279:723—725.

## 第 37 章

### 入门读物

Lester, H. A., 1977. The response to acetylcholine (对乙酰胆碱的反应), *Sci. Amer.* 236(2): 106—118.

Keynes, R. D., 1979. Ion channels in the nerve-cell membrane (神经细胞膜中的离子通道), *Sci. Amer.* 240(3):126—135.

Rushton, W. A. H., 1975. Visual pigments and color blindness (视觉色素和色盲), *Sci. Amer.* 232(3):64—74.

Adler, J., 1976. The sensing of chemicals by bacteria (细菌对化学品的感觉), *Sci. Amer.* 234(4): 40—47.

Berg, H., 1975. How bacteria swim (细菌如何游动), *Sci. Amer.* 233(2):36—44.

### 专著

Kuffler, S. W., and Nicholls, J. G., 1976. *From Neuron to Brain*. Sinauer. [这本好书的第二部分出色地论述了神经元的信号传递机制.]

Katz, B., 1966. *Nerve, Muscle, and Synapse*. McGraw-Hill. [极好的简明导论.]

Cone, R. A., and Dowling, J. E., (eds.), 1979. *Membrane Transduction Mechanisms*. Raven Press. [各种可兴奋膜系统的简明易懂的概述.]

Aidley, D. J., 1977. *The Physiology of Excitable Cells* (2nd ed.). Liverpool University Press.

### 神经轴突传导

Hille, B., 1978. Ionic channels in excitable membranes: current problems and biophysical approaches (可兴奋膜中的离子通道: 当前的问题和生物物理方法), *Biophys. J.* 22:283—294.

Barchi, R. L., Cohen, S. A., and Murphy, L. E., 1980. Purification from rat sarcolemma of the saxitoxin-binding component of the excitable membrane sodium channel (从鼠肌纤膜中纯化可兴奋膜钠通道的蛤蚌毒素结合组分), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77:1306—1310.

Morell, P., and Norton, W. T., 1980. Myelin (髓磷脂), *Sci. Amer.* 242(5):88—118.

Ritchie, J. M., and Rogart, R. B., 1977. Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath (哺乳动物有髓神经纤维中钠通道的密度以及在髓磷脂鞘下轴突膜的性质), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:211—215.

### 突触的传导

Axelrod, J., 1974. Neurotransmitters (神经传递介质), *Sci. Amer.* 230(6):59—71.

Heidmann, T., and Changeux, J. -P., 1978. Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states (纯化的及膜结合的乙酰胆碱受体蛋白的结构和功能性质), *Ann. Rev. Biochem.* 47:317—357.

Raftery, M. A., Hunkapiller, M. W., Strader, C. D., and Hood, L. E., 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits (乙酰胆碱受体: 同源亚基的复合物), *Science* 208:1454—1457.

Klymkowsky, M. W., and Stroud, R. M., 1979. Immunospecific identification and three-dimensional structure of a membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo californica* (加利福尼亚电鳗的膜结合乙酰胆碱受体的免疫专属鉴别和三维结构), *J. Mol. Biol.* 128:319—334.

Moore, H. H., Hartig, P. R., and Raftery, M. A., 1979. Correlation of polypeptide composition with functional events in acetylcholine receptor-enriched membranes from *Torpedo californica* (加利福尼亚电鳗富含乙酰胆碱受体的膜中多肽组成与功能事件间的关系), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:6265—6269.

Fulpius, B. W., Miskin, R., and Reich, E., 1980. Antibodies from myasthenic patients that compete with cholinergic agents for binding to nicotinic receptors (肌无力病人的抗体与胆碱能制剂竞争同烟碱受体结合), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 4326—4330.

Hess, G. P., Lipkowitz, S., and Struve, G. E., 1978. Acetylcholine-receptor mediated ion flux in electroplax membrane microsacs (vesicles): change in mechanism produced by asymmetrical distribution of sodium and potassium ions (电板膜微囊[泡]中乙酰胆碱受体介导的离子流动: 由钠和钾离子的不对称分布引起的机制变化), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:1703—1707.

Anglister, L., and Silman, I., 1978. Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase (伸长状的电鳗乙酰胆碱酯酶的分子结构), *J. Mol. Biol.* 125:293—311.

## 视觉

Miller, W. H., (ed.), 1981. *Molecular Mechanisms of Photoreceptor Transduction*. Academic Press.

Hagins, W. A., 1979. Excitation in vertebrate photoreceptors (脊椎动物光受器的兴奋), In Schmitt, F. O., and Worden, F. G., (eds.), *The Neurosciences: Fourth Study Program*, pp. 183—191. MIT Press.

Hubbell, W. L., and Bownds, M. D., 1979. Visual transduction in vertebrate photoreceptors (脊椎动物光受器中视觉的传导), *Ann. Rev. Neurosci.* 2:17—34.

Wald, G., 1968. The molecular basis of visual excitation (视兴奋的分子基础), *Nature* 219: 800—807. [这个诺贝尔演讲有趣地论述了视觉中基本事件的发现.]

Young, R. W., 1970. Visual cells (视觉细胞), *Sci. Amer.* 223(4):80—91.

Dowling, J. E., 1966. Night blindness (夜盲), *Sci. Amer.* 215(4):78—84.

MacNichol, E. F., Jr., 1964. Three-pigment color vision (三色素色觉), *Sci. Amer.* 211 (6): 48—56.

Yoshikami, S., George, J. S., and Hagins, W. A., 1980. Light-induced calcium fluxes from outer segments layer of vertebrate retinas(光诱导的脊椎动物视网膜外段层的钙的流出), *Nature* 286: 395—398.

Pober, J. S., and Bitensky, M. W., 1979. Light-regulated enzymes of vertebrate retinal rods (脊椎动物视网膜视杆细胞的光调节酶), *Advan. Cyclic Nucleotide. Res.* 11: 265—301.

Liebman, P. A., and Pugh, E. N., Jr., 1979. The control of phosphodiesterase in rod disk membranes: kinetics, possible mechanisms, and significance for vision (视杆细胞圆盘膜中磷酸二酯酶的控制: 动力学、可能的机制和对视觉的意义), *Vision Res.* 19:375—380.

Fung, B. K.-K., and Stryer, L., 1980. Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments (视网膜视杆细胞外段中光解视紫红质催化结合 GDP 被 GTP 的置换), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77:2500—2504.

## 趋化性

Koshland, D. E. Jr., 1979. A model regulatory system: bacterial chemotaxis (调节系统的一个模式: 细菌的趋化性), *Physiol. Rev.* 59:811—862.

Macnab, R., and Koshland, D. E., Jr., 1972. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis (细菌趋化性中梯度感觉机制), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69:2509—2512. [这些实验揭示, 细菌察觉瞬时而不是空间的梯度.]

Springer, M. S., Goy, M. F., and Adler, J., 1979. Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction (在行为控制机制和信号传导中蛋白质的甲基化作用), *Nature*. 280:279—284.

Silverman, M. R., and Simon, M. I., 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility (鞭毛旋转和细菌运动力的机制), *Nature* 249:73—74.

Manson, M. D., Tedesco, P., Berg, C., Harold, F. M., and van der Drift, C., 1977. A propulsive force drives bacterial flagella (质子移动力推动细菌鞭毛), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:3060—3064.

Manson, M. D., Tedesco, P. M., and Berg, H. C., 1980. Energetics of flagellar rotation in bacteria (细菌鞭毛旋转的力能学), *J. Mol. Biol.* 138:541—561.

Khan, S., and Macnab, R. M., 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility (质子化学势、质子电势和细菌的运动力), *J. Mol. Biol.* 138:599—614.

Stock, J. B., and Koshland, D. E., Jr., 1978. A protein methyltransferase involved in bacterial sensing (细菌感觉过程中涉及的蛋白质甲基酯酶), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75:3659—3663.

Kondoh, H., Ball, C. B., and Adler, J., 1979. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli* (大肠杆菌的核糖和半乳糖化学感受器的接受甲基的趋化性蛋白质的鉴别), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:260—264.

Berg, H. C., and Purcell, E. M., 1977. Physics of chemoreception (化学感受的物理学), *Biophys. J.* 20:193—219.

## 习题答案

### 第2章

- (a) 异硫氰酸苯酯。  
(b) 丹磺酰氯。  
(c) 脲:  $\beta$ -巯基乙醇还原二硫化物。  
(d) 糜蛋白酶。  
(e) CNBr。  
(f) 胰蛋白酶。
- (a) 3; (b) 12; (c) 4.28; (d) 9.8; 和 (e) 2.4。
- 0.01; 0.1; 1; 10; 和 100。
- 477Å (每股318残基, 每个残基1.5Å)。
- 除了羧基末端的那一个外, 每个氨基酸残基在和胍的反应中都产生一个胍基。羧基末端残基可由它能生成一个游离氨基酸而被鉴定。
- (a) 约为 +1。  
(b) 两个肽。
- S-氨基半胱氨酸侧链和赖氨酸的侧链相似, 仅有的区别是以S原子取代次甲基。
- 胰岛素的天然构象并不是热力学上最稳定的形式。进一步的探讨可见659页。

### 第3章

- (a)  $2.96 \times 10^{-11} \text{g}$ 。  
(b)  $2.71 \times 10^8$  个分子。  
(c) 否。如果以立方晶体点阵堆积, 一个红细胞中将有  $3.22 \times 10^8$  个血红蛋白分子。所以实际的堆积密度大约是最大可能堆积密度的84%。
- 2.65g (或  $4.75 \times 10^{-2} \text{mol}$ ) Fe。
- (a) 在人体中, 每kg肌肉与  $1.44 \times 10^{-2} \text{g}$  ( $4.49 \times 10^{-4} \text{mol}$ )  $\text{O}_2$  结合。在抹香鲸中, 每kg肌肉与 14.4g ( $4.49 \times 10^{-3} \text{mol}$ )  $\text{O}_2$  结合。  
(b) 128。
- (a) 在pH 2下约为 +36, pH 7下约为 +4 和 pH 9下约为 +2。  
(b) 约为10。但是, 在可滴定的基团之间有相互作用。实际等电点是8.2。这个问题的一个极好的论述, 见S.J. Shire, G.I.H. Hanania和F.R.N. Gurd, *Biochemistry* 13 (1974): 2967。
- (a) 由残基 1至55, 56至131和132至153组成的三段肽。  
(b) 短 $\alpha$ 螺旋在水溶液中的稳定性很强。它们在肌红蛋白中被三级结构的相互作用所稳定。
- $\log \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}]} = \log p\text{O}_2 - \log p_{50}$
- (a)  $k_{\text{off}} = 20 \text{s}^{-1}$   
$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (\text{off} \text{——解离, on} \text{——复合})$$
  
(b) 平均持续时间是0.05s ( $k_{\text{off}}$ 的倒数)。
- 1mg/ml肌红蛋白溶液 (17.8kdal) 相当于  $5.62 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 。1cm光程的吸光率是0.84, 对应的  $I_0/I$  比为6.96。所以, 入射光的14.4%透过去了。

### 第4章

- (a) 氧亲和性增加; (b) 减少; (c) 减少和 (d) 增加。
- (a和b)  $\text{H}^+$  结合得少了。
- 肌醇六磷酸。
- (a)  $\Delta Y = .977 - .323 = .654$ 。  
(b)  $\Delta Y = .793 - .434 = .359$ 。
- pK (a) 降低; (b) 升高和 (c) 升高。

- 在充氧作用中增加的甲基阻碍了铁原子向卟啉平面的运动。这种模型化合物模拟了血红蛋白的T状态。引人入胜的讨论，见J.P. Collman, J.L. Brauman, K.M. Doxsee, T.R. Halbut, and K.S. Suslick, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75 (1978): 564.
- (a) 是。 $K_{AB} = K_{BA} (K_B K_A) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。  
(b) A的存在增加了B的结合，而B的存在又增加了A的结合。
- 结合到一个血红素上的一氧化碳改变了同一个血红蛋白分子中其他血红素的氧亲和性。尤其是，CO增加血红蛋白的氧亲和性，所以减少了新陈代谢活跃的组织释放出 $\text{O}_2$ 的量。一氧化碳稳定氧合血红蛋白的特征四级结构。换言之，CO模拟 $\text{O}_2$ 推动了变构作用。
- (a) 对于最大运载量， $K = 10^{-5} \text{ mol} / \text{L}$ 。一般来说，当 $K = \sqrt{L_A L_B}$ 时达到运载量的最大值。  
(b) 对于最大运载量， $P_{50} = 44.7 \text{ torr}$ ，明显高于生理值26 torr。但是，必须强调指出这计算忽略了协同结合和波尔(Bohr)效应。

## 第5章

- (a) 在位置6的赖氨酸或精氨酸。  
(b) 在pH 8下，这种血红蛋白向正极迁移的速度最小，因为在三种血红蛋白中它所具有的净负电荷最小。
- (a) Hb C; (b) Hb D; (c) Hb J; (d) Hb N。
- 在 $\alpha$ 基因中的突变影响到所有三种血红蛋白，因为它们的亚基结构分别是 $\alpha_2\beta_2$ ， $\alpha_2\delta_2$ ，和 $\alpha_2\gamma_2$ 。在 $\beta$ 、 $\delta$ 或 $\gamma$ 基因中的突变只影响到其中的一种。
- 反应

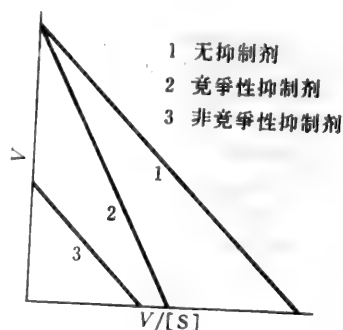


与一个电泳实验持续的时间相比是快的。在电场中 $\alpha_2\beta_2$ 和 $\alpha_2\beta_2^+$ 的分离使平衡向右移动。

- 脱氧Hb A包含有一个互补的部位，这样它可以加到一个脱氧Hb S的纤维上。于是纤维就不能再继续生长了，因末端脱氧Hb A分子缺少一个粘结点。
- 在脱氧血红蛋白Kmpscy中，脱氧血红蛋白A的 $\alpha_1\beta_2$ 界面上的天冬氨酸-酪氨酸氢键不见了。(99页)。所以，这种突变种的脱氧型式比正常血红蛋白更容易离解为二聚体。相反，这些血红蛋白的氧合形式离解程度却几乎相同，因为两者都不被这个氢键所稳定。

## 第6章

- (a)  $31.1 \times 10^{-6} \text{ mol}$ 。  
(b)  $5 \times 10^{-8} \text{ mol}$ 。  
(c)  $622 \text{ s}^{-1}$ 。
- (a) 是， $K_M = 5.2 \times 10^{-6} \text{ mol} / \text{L}$ 。  
(b)  $V_{\max} = 6.84 \times 10^{-10} \text{ mol}$ 。  
(c)  $337 \text{ s}^{-1}$ 。
- (a) 在没有抑制剂存在时， $V_{\max}$ 是 $47.6 \mu\text{mol} / \text{min}$ 和 $K_M$ 是 $1.1 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{L}$ 。在抑制剂存在时， $V_{\max}$ 不变，而表现的 $K_M$ 是 $3.1 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{L}$ 。  
(b) 竞争性抑制。  
(c)  $1.1 \times 10^{-3} \text{ mol} / \text{L}$ 。  
(d)  $f_{ES}$ 是0.243和 $f_{EI}$ 是0.488。  
(e)  $f_{ES}$ 在没有抑制剂时是0.73，当存在 $2 \times 10^{-3} \text{ mol} / \text{L}$ 抑制剂时是0.49。这些值的比为1.49，它与这些条件下的反应速度之比相同。
- (a)  $V_{\max}$ 是 $9.5 \mu\text{mol} / \text{min}$ ， $K_M$ 是 $1.1 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{L}$ ，和没有抑制剂时相同。  
(b) 非竞争性抑制。  
(c)  $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} / \text{L}$ 。  
(d) 不论有没有这个非竞争性抑制剂，均为0.73。
- (a)  $V = V_{\max} - (V / [S]) K_M$ 。  
(b) 斜率 =  $-K_M$ ，y截距 =  $V_{\max}$ ，x截距 =  $V_{\max} / K_M$ 。  
(c) 见右图。
- 一个竞争性抑制剂结合到一个变构酶的活性部位上可以增加同一酶分子上另一些部位结合底物的亲和性。在这个协调模型中，这个竞争性抑制剂是这样通过促进 $T \rightarrow R$ 的转变来起作用的。
- 在pH 7下可能的氢键供体是下列残基的侧链：精氨酸、天冬酰胺、谷酰胺、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸和酪氨酸。
- A和B的利用速度由式





$$V_A = \left( \frac{k_2}{K_M} \right)_A [E][A] \quad \text{和} \quad V_B = \left( \frac{k_2}{K_M} \right)_B [E][B]$$

给出。所以，它们的速度之比为

$$V_A/V_B = \left( \frac{k_2}{K_M} \right)_A [A] / \left( \frac{k_2}{K_M} \right)_B [B]$$

因此，一个酶是根据  $k_2/K_M$  的数值，而不是由  $K_M$  单独区别竞争着的底物。

## 第7章

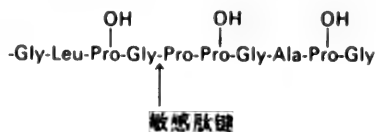
1. 最快的是 (b)，最慢的是 (a)。
2. (a) B-C；(b) A-B 或 E-F；和 (c) A-B-C (一个糖残基并不和酶相互作用，这样就回避在能量上不利的部位 D)。
3.  $^{18}\text{O}$  出现在 di-NAG (残基 E-F) 的 C-4 羟基中。
4. 这个类似物在 C-5 上缺少一个腈基的取代基，于是它有可能无需变形就结合到部位 D 上。所以，这个类似物的残基 D 的结合在能量上可能是有利的，而 tetra-NAG 的残基 D 的结合要花费自由能。见 P. van Eijkeren 和 D. M. Chipman, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972): 4788。
5. (a) 在氧合肌红蛋白中，Fe 键合五个氮和一个氧。在羧肽酶 A 中，Zn 键合两个氮和两个氧。  
(b) 在氧合肌红蛋白中，与铁成键的氮原子中有一个来自邻近的组氨酸残基，而其余四个来自于血红素。与 Fe 相连的氧原子来自  $\text{O}_2$ 。羧肽酶 A 中，与 Zn 配位的两个氮原子来自组氨酸残基。氧配位基中一个来自谷氨酸侧链，另一个来自水分子。  
(c) 天冬氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸。
6. 当羧肽酶 A 催化 N-苯甲酰甘氨酸和 L-苯丙氨酸间的一个肽键合成时，形成了由  $^{18}\text{O}$  标记的  $\text{H}_2\text{O}$ 。在 L-β-苯乳酸存在时， $^{18}\text{O}$  不转变，因为这个化合物缺少一个 α-氨基，这样肽键就不能形成了。关于这些实验的讨论见 R. Breslow 和 D. L. Wernick, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74 (1977): 1303。

## 第8章

1. (a) 羧肽酶 A。  
(b) 溶菌酶和羧肽酶 A。  
(c) 糜蛋白酶。  
(d) 羧肽酶 A 和糜蛋白酶。
2. (a) 是。  
(b) 在糜蛋白酶中的组氨酸 57，在溶菌酶中的谷氨酸 35，和羧肽酶 A 中的酪氨酸 248。
3. 糜蛋白酶中的丝氨酸 195 和羧肽酶 A 中的谷氨酸 270 (或一个羟基离子)。
4. 催化残基和底物的精确定位，几何应变 (底物的畸变)，电子应变和底物的脱溶剂作用。
5. (a) 甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮 (TLCK)。  
(b) 第一，确定底物是否保护胰蛋白酶不因 TLCK 而失活；  
第二，确定 TLCK 的 D-异构体是否使胰蛋白酶失活。  
(c) 凝血酶。
6. (a) 丝氨酸。  
(b) 一个半缩醛在抑制剂的羰基和活性部位丝氨酸的羟基之间。
7. 硼原子与活性部位丝氨酸的氧原子成键。这种四面体中间物和过渡态在几何上相似。
8. 活化后的因子 X 仍然结合在血小板膜上，这加速了凝血酶原的活化。
9. 抗凝血酶 III 可能是一个过渡态类似物，所以它和凝血酶的相互作用取决于一个完全成形的活化部位的存在。
10. 残基 a 和 d 位于一个 α-螺旋盘绕的卷曲内部，靠近超螺旋的轴。这些侧链间疏水相互作用为盘绕卷曲的稳定性作出了贡献。有关讨论见 G. E. Schulz 和 R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure* (Springer-Verlag, 1978), p. 79。

## 第9章

1. (a) 在每股胶原三重螺旋中每第三个残基必须是甘氨酸，因为要容纳较大的残基，空间就不够了。  
(b) poly (Gly-Pro-Gly) 比 poly (Gly-Pro-Pro) 溶解的温度较低。  
(c) 不。甘氨酸并不占据每个第三位置。
2. (a) 和 (b)



3. (a) 二硫化物。  
(b) 非共价交联。  
(c) 特定谷酰胺和赖氨酸侧链间的肽链。  
(d) 醛醇交联, 组氨酸-醛醇交联, 和赖氨酸基正亮氨酸。  
(e) 醛醇交联, 赖氨酸基正亮氨酸和锁链(赖氨酸)素。
4.  $\alpha$ -酮戊二酸的脱羧基作用是半个生理反应。很可能是 $\alpha$ -酮戊二酸首先被氧攻击, 生成一个过氧酸, 然后过氧酸与脯氨酸底物反应。有关该实验和它的机理含义的讨论, 见 D. F. Counts, G. J. Cardinale 和 S. Udenfriend, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75 (1978): 2145。

## 第10章

1.  $2.86 \times 10^6$  个分子。
2. 环丙烷环影响了烃链的有序堆积, 这样就增加了膜的流动性。
3.  $2 \times 10^{-7} \text{ cm}$ ,  $6.32 \times 10^{-6} \text{ cm}$ , 和  $2 \times 10^{-4} \text{ cm}$ 。
4. 这个分子的半径是  $3.08 \times 10^{-7} \text{ cm}$  和它的扩散系数是  $7.37 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 。横向移动的平均距离是一微秒内为  $1.72 \times 10^{-7} \text{ cm}$ , 一毫秒内为  $5.42 \times 10^{-6}$ , 和一秒内为  $1.72 \times 10^{-4} \text{ cm}$ 。
5. 顺磁共振振幅在起始时减小, 起因于双层外叶片中自旋标记磷脂酰胆碱的还原。在这些实验条件下抗坏血酸并不横越膜。这样它就不能还原内层叶片中的磷脂。残基谱的缓慢衰减是由于翻转到双层外叶片上的磷脂受到还原。

## 第11章

1. 反应 (a) 和 (c) 向左; 反应 (b) 和 (d) 向右。
2. 什么都没有告诉我。
3. (a)  $\Delta G^{0'} = +7.5 \text{ kcal/mol}$ ,  $K'_{eq} = 3.16 \times 10^{-6}$ 。  
(b)  $3.16 \times 10^4$ 。
4.  $\Delta G^{0'} = 1.7 \text{ kcal/mol}$ 。平衡比为 17.8。
5. (a)  $+0.2 \text{ kcal/mol}$ 。  
(b)  $-7.8 \text{ kcal/mol}$ 。PP<sub>i</sub> 的水解将反应推向乙酰 CoA 的形成。
6. (a)  $\Delta G^0 = 2.303 RT \text{ pK}$ 。  
(b)  $-6.53 \text{ kcal/mol}$ , 25°C 下。
7. 有一个 ADP 单位 (CoA 则有一个极为相近的衍生物)。
8. 在大多数生物体内硫酸盐的活化形式为 3'-磷酸腺苷 5'-磷酸。参看 P.W. Robbins 和 F. Lipmann, *J. Biol. Chem.* 229 (1957): 837。

## 第12章

1. (a) 醛糖-酮糖对; (b) 差向异构体; (c) 醛糖-酮糖对; (d) 异头体; (e) 醛糖-酮糖对; (f) 差向异构体。
2. 丙酮酸的甲基碳为  $^{14}\text{C}$  所标记。
3. (a) 对于下列反应  

$$\text{葡萄糖} + 2 \text{ P}_i + 2 \text{ ADP} \longrightarrow 2 \text{ 乳酸} + 2 \text{ ATP}$$
 $\Delta G^{0'}$  为  $-29.5 \text{ kcal/mol}$ 。  
 (b)  $\Delta G' = -27.2 \text{ kcal/mol}$ 。
4.  $3.06 \times 10^{-5}$ 。
5. 果糖 1,6-二磷酸, 二羟丙酮磷酸和甘油醛 3-磷酸的平衡浓度分别为  $7.76 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ,  $2.24 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  和  $2.24 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。
6. 2,3-DPG 的所有三个碳原子都为  $^{14}\text{C}$  所标记。连在 C-2 羟基上的磷原子为  $^{32}\text{P}$  所标记。
7. 无糖时己糖激酶的 ATP 酶活性低, 因为此时它以一种无催化活性的构象存在 (208 页)。加入木糖使酶的两半之间裂缝闭合, 但木糖没有 C-6 上的羟甲基, 所以它不能被磷酸化。在正常情况下为 C-6 羟甲基所占据的部位, 现在被水分子所占据, 而水则接受来自 ATP 的磷酸基。
8. x 射线结晶学的研究 [S.I. Winn, H.C. Watson, R.N. Harkins 和 L.A. Fothergill, *Biochem. Soc. Trans.* 5 (1978): 657-659] 说明 3-磷酸甘油酸与此酶的活性部位结合, 此部位中组氨酸 184 被磷酸化而组氨酸 8 是游离的。磷酸组氨酸 184 将其磷酸基转移给底物, 其结果是形成 2,3-二磷酸甘油酸。然后这一中间产物的 3-位上的磷酸基转移给组氨酸 8, 于是产生 2-磷酸甘油酸。随后磷酸基又由组氨酸 8 转移到组氨酸 184, 于是酶的原形式又再生出来。注意这种催化机理与二磷酸甘油酸变位酶类似 (213 页)。

## 第13章

- (a) 柠檬酸循环运转一轮以后, 标记出现在草酰乙酸的C-2和C-3中。  
(b) 柠檬酸循环运转一轮以后, 标记出现在草酰乙酸的C-1和C-4中。  
(c) 当丙酮酸形成乙酰CoA时, 标记出现在CO<sub>2</sub>中。  
(d和e) 同(a)的情况。
- 否, 因为在循环的两个脱羧步骤中丢失了两个碳原子。因此, 没有草酰乙酸的净合成。
- 0.90, 0.03和0.07。
- 9.8kcal/mol。
- 甘油醛3-磷酸脱氢酶对辅酶的立体异构专一性与乙醇脱氢酶的恰好相反(分别为类型B与类型A)。
- 硫胺素噻唑酮焦磷酸是一种过渡状态的类似物。这一类似物的含硫的环不带电荷, 所以它和硫胺素所催化的反应中正常辅酶的过渡状态极为相似(例如, 羟乙基-TPP的不带电荷的共振形式, 223页)。关于这一类似物的讨论, 可参看J. A. Gutowski和G. E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* 251 (1976): 2863。
- 要形成草酰乙酸, 苹果酸与草酰乙酸之比必须大于 $1.75 \times 10^4$ 。

## 第14章

- (a) 15; (b) 2; (c) 38; (d) 16; (e) 36; (f) 19。
- (a) 反应  $2G-SH + \frac{1}{2}O_2 \rightleftharpoons G-S-S-G + H_2O$  的  $\Delta E_0'$  为 +1.05V,  $\Delta G^0'$  为 -48.4kcal/mol。  
(b)  $\Delta E_0' = +0.09V$ ,  $\Delta G^0'$  为 -4.15kcal/mol。
- (a) 阻断部位3上的电子传递和质子的泵动。  
(b) 由于抑制ATP与ADP通过线粒体内膜的交换而阻断电子传递和ATP的合成。  
(c) 阻断部位1上的电子传递和质子的泵动。  
(d) 通过耗散质子梯度而阻断ATP的合成但不抑制电子的传递。  
(e) 阻断部位3上的电子传递和质子的泵动。  
(f) 阻断部位2上的电子传递和质子的泵动。
- 寡霉素由于干扰质子梯度的利用而抑制ATP的形成。它并不阻断电子传递。
- 由NAD<sup>+</sup>氧化时  $\Delta G^0'$  为 +16.1kcal/mol, 由FAD氧化时为 +1.4kcal/mol。NAD<sup>+</sup>还原琥珀酸在热力学上是不可能的。
- 氰化物能够致死, 因为它与细胞色素(a + a<sub>3</sub>)的高铁型结合, 从而抑制氧化磷酸化。亚硝酸根把亚铁血红蛋白转变为高铁血红蛋白, 后者也与氰化物结合。因此, 高铁血红蛋白与细胞色素(a + a<sub>3</sub>)竞相争夺氰化物。这种竞争作用在治疗方面是有用的, 因为在不减少氧传递的条件下所能形成的高铁血红蛋白的量比细胞色素(a + a<sub>3</sub>)的量得多。
- 从转运2, 3和4个质子所得到的有效自由能分别为-9.23, -13.8和-18.5kcal。在标准状况下合成一摩尔ATP所消耗的自由能为7.3kcal。因此, 余下的自由能即-1.93, -6.5和-11.2kcal能推动ATP的合成直到[ATP]/[ADP][P<sub>i</sub>]的比值分别为 $26.2 \times 10^4$ ,  $6.51 \times 10^4$ 和 $1.62 \times 10^8$ 为止。在这一比值大于10<sup>4</sup>之前, 分离的线粒体的悬液, 不能合成ATP。这表明每合成一个ATP至少要有三个质子的转运。

## 第15章

- (a) 5 葡萄糖6-磷酸 + ATP → 6 核糖5-磷酸 + ADP + H<sup>+</sup>  
(b) 葡萄糖6-磷酸 + 12NADP<sup>+</sup> + 7H<sub>2</sub>O → 6CO<sub>2</sub> + 12NADPH + 12H<sup>+</sup> + P<sub>i</sub>
- 标记出现在核酮糖5-磷酸的C-5上。
- 异柠檬酸氧化脱羧为α-酮戊二酸的反应。在两个反应中均形成一个β-酮酸中间产物。
- 果糖6-磷酸的C-1和C-3被标记, 而赤藓糖4-磷酸不被标记。
- 反应b和c会被阻断。
- 先使酮糖底物与转酮醇酶形成希夫碱, 用氚标记的NaBH<sub>4</sub>还原希夫碱, 然后作已标记的酶的指印。

## 第16章

- 半乳糖 + ATP + UTP + H<sub>2</sub>O + 糖原<sub>n</sub> → 糖原<sub>n+1</sub> + ADP + UDP + 2P<sub>i</sub> + H<sup>+</sup>
- 果糖 + 2ATP + 2H<sub>2</sub>O → 葡萄糖 + 2ADP + 2P<sub>i</sub>
- 缺乏分枝酶。
- 在冯·基尔科(von Gierke)氏病中葡萄糖6-磷酸的浓度提高了。于是糖原合成酶的磷酸化的D型就有活性。
- 葡萄糖是磷酸化酶α的变构抑制剂。因此, 在它存在下长出的结晶是处于T状态的。加入底物葡萄糖1-磷酸使R = T平衡移向R状态。这两种状态之间在构象上的差别是足够大的, 除非这些结晶为化学键的交联所稳定化, 否则就会破碎。豪罗威茨首次观察到, 当脱氧血红蛋白的晶体发生氧合作用时, 变构的转变能引起晶体的破碎。

6. 赫斯, H.G. (H.G. Hers) [Ann. Rev. Biochem. 45 (1976): 167] 提出: 这些动力学变化可以保证亚基B的脱磷酸化有一延迟时间, 于是在磷酸化酶的激酶被其磷酸酶钝化之前糖原先发生降解。

## 第17章

- (a) 甘油 +  $2\text{NAD}^+ + \text{P}_i + \text{ADP} \longrightarrow \text{丙酮酸} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NADH} + \text{H}^+$   
(b) 甘油激酶和甘油磷酸脱氢酶。
- 硬脂酸 +  $\text{ATP} + 13\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O} + 8\text{FAD} + 8\text{NAD}^+ \longrightarrow 4\frac{1}{2}\text{乙酰乙酸} + 12\frac{1}{2}\text{H}^+ + 8\text{FADH}_2 + 8\text{NADH} + \text{AMP} + 2\text{P}_i$
- (a) 在线粒体中氧化, 在细胞质中合成。  
(b) 氧化需要乙酰CoA, 合成需要载体蛋白。  
(c) 氧化需要FAD和 $\text{NAD}^+$ , 合成需要NADPH。  
(d) 氧化的中间产物是3-羟酰基CoA的L-异构体, 合成的是D-异构体。  
(e) 氧化时是羧基变为甲基, 合成时是甲基变为羧基。  
(f) 脂肪酸合成的酶组成一多酶复合物, 氧化作用的酶则否。
- (a) 棕榈油酸; (b) 亚油酸; (c) 亚油酸; (d) 油酸; (e) 油酸; (f) 亚油酸。
- C-1的放射性较强 (参看511页, 关于用实验方法阐明多肽链合成方向的讨论)。
- (a) 是。  
 $2\text{乙酰CoA} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{FAD} + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow \text{草酰乙酸} + 2\text{CoA} + \text{FADH}_2 + 2\text{NAD} + 4\text{H}^+$   
(b) 是, 因为通过葡萄糖异生途径可由草酰乙酸合成葡萄糖。

## 第18章

- (a) 丙酮酸; (b) 草酰乙酸; (c)  $\alpha$ -酮戊二酸; (d)  $\alpha$ -酮基异己酸; (e) 苯丙酮酸; (f) 羟苯丙酮酸。
- 天冬氨酸 +  $\alpha$ -酮戊二酸 +  $\text{GTP} + \text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \frac{1}{2}\text{葡萄糖} + \text{谷氨酸} + \text{CO}_2 + \text{ADP} + \text{GDP} + \text{NAD}^+ + 2\text{P}_i$
- 天冬氨酸 +  $\text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + 3\text{ATP} + \text{NAD}^+ + 4\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{草酰乙酸} + \text{脲} + 2\text{ADP} + 4\text{P}_i + \text{AMP} + \text{NADH} + \text{H}^+$
- (a) 用 $^{14}\text{C}$ 标记L-甲基丙二酸单酰CoA的甲基碳原子。确定 $^{14}\text{C}$ 在琥珀酰CoA中的地位。所转移的基团是与标记碳原子形成键的。  
(b) 用 $^{14}\text{C}$ 标记L-甲基丙二酸草酰CoA的甲基碳原子, 并用 $^{35}\text{S}$ 标记其CoA部分。假若琥珀酰CoA既含有 $^{14}\text{C}$ 又含有 $^{35}\text{S}$ , 那么—C—O—S—CoA基团的转移就是分子内的。  
(c) 来自L-甲基丙二酸草酰CoA的甲基中的质子直接转移给相邻的碳原子了。
- 硫胺素焦磷酸。

## 第19章

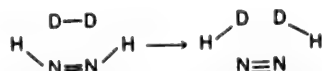
- $\Delta E_0' = +0.28\text{V}$ ,  $\Delta G^0' = -12.9\text{kcal/mol}$ 。
- 醛缩酶参加卡尔文循环, 而转醛醇酶参加戊糖磷酸途径。
- 3-磷酸甘油酸的浓度会增高, 而核酮糖1,5-二磷酸的浓度会降低。
- 3-磷酸甘油酸的浓度会降低, 而核酮糖1,5-二磷酸的浓度会增高。
- 藻红素和藻蓝素起着天线分子的作用。它们吸收叶绿素a所不吸收的光谱范围内的光, 然后将它们的电子激发能传递给叶绿素a。
- (a) 它表达了光合作用中的一个关键问题: 即水是由光裂解的。光合作用中所放出的氧来自于水。  
(b) 呼吸作用的范·尼尔方程式表示这一事实: 葡萄糖的燃烧需要加入六分子 $\text{H}_2\text{O}$ 。可参看G. Wald关于细胞呼吸的重要讨论, 见 *Current Aspects of Biochemical Energetics*, N.O. Kaplan and E.P. Kennedy, eds. (Academic Press, 1966), pp. 27—37。
- 加入吡啶使类囊体空间中贮藏质子的能力增加了。于是有更多已泵入的质子在暗中流过合成ATP的复合物。关于这一实验的讨论, 可参看M. Avron, *Ann. Rev. Biochem.* 46 (1977): 145。
- DCMU抑制光系统II和光系统I之间的链条中电子在Q和质体醌之间的传递。如果有一种人工的电子受体, 例如高铁氧化物能够接受来自Q的电子, 那么在DCMU存在下仍可发生放氧。

## 第20章

- 甘油 +  $4\text{ATP} + 3\text{脂肪酸} + 4\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{三酰基甘油} + \text{ADP} + 3\text{AMP} + 7\text{P}_i + 4\text{H}^+$
- 甘油 +  $3\text{ATP} + 2\text{脂肪酸} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CTP} + \text{丝氨酸} \longrightarrow \text{磷脂酰丝氨酸} + \text{CMP} + \text{ADP} + 2\text{AMP} + 6\text{P}_i + 3\text{H}^+$
- (a) CDP-二酰基甘油; (b) CDP-乙醇胺; (c) 酰基CoA; (d) CDP-胆碱; (e) UDP-葡萄糖或UDP-半乳糖; (f) UDP-半乳糖; (g) 牻牛儿基焦磷酸。
- (a和b) 无, 因为标记以 $\text{CO}_2$ 的形式丢失了。

## 第21章

- 葡萄糖 + 2ADP + 2P<sub>i</sub> + 2NAD<sup>+</sup> + 2谷氨酸 → 2丙氨酸 + 2α-酮戊二酸 + 2ATP + 2NADH + H<sup>+</sup>
- N<sub>2</sub> → NH<sub>4</sub><sup>+</sup> → 谷氨酸 → 丝氨酸 → 甘氨酸 → δ-氨基酮戊酸 → 胆色素原 → 血红素
- (a) 四氢叶酸; (b) 四氢叶酸和 (c) N<sup>5</sup>-甲基四氢叶酸。
- γ-谷酰基磷酸可能是反应中间产物。
- 使用甘氨酸导致异戊酰甘氨酸的形成。这种水溶性的结合物与异戊酸不同, 它能迅速被肾脏排出。  
参看 R. M. Cohn, M. Yudkoff, R. Rothman, and S. Segal, *New Engl. J. Med.* 299 (1978): 996。
- H-D 的交换指明一种二亚胺中间产物的存在。参看 W. A. Bulen, *Proc. Int. Symp. N<sub>2</sub> Fixation* (Washington State University Press, 1976)。



- 它们进行固氮作用。光系统 II 的缺乏提供了一种不产生 O<sub>2</sub> 的环境。回忆一下固氮酶会迅速被 O<sub>2</sub> 所钝化。关于异形细胞的讨论, 参看 R. Y. Stanier, E. A. Adelberg 和 J. L. Ingraham 所著 *The Microbial World*, 第 4 版 (Prentice-Hall, 1976), 542-544 页。

## 第22章

- 葡萄糖 + 2ATP + 2NADP<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O → PRPP + CO<sub>2</sub> + ADP + AMP + 2NADPH + H<sup>+</sup>
- 谷酰胺 + 天冬氨酸 + CO<sub>2</sub> + 2ATP + NAD<sup>+</sup> → 乳清酸 + 2ADP + 2P<sub>i</sub> + 谷酰胺 + NADH + H<sup>+</sup>
- (a, c, d 和 e) PRPP; (b) 氨甲酰磷酸。
- PRPP 和 甲酰甘氨酸胺核糖核苷酸。
- dUMP + 丝氨酸 + NADPH + H<sup>+</sup> → dTMP + NADP<sup>+</sup> + 甘氨酸
- 缺乏 N<sup>10</sup>-甲基基四氢叶酸。磺酰胺是对-氨基苯甲酸的类似物, 因此抑制叶酸的合成, 而对-氨基苯甲酸是叶酸的前体之一。
- PRPP 是下列各生物合成反应的活化中间产物: (a) 嘌呤新合成途径中磷酸核糖胺的合成; (b) 通过补救途径由游离的碱合成嘌呤核苷酸; (c) 形成嘧啶时乳清酸核苷酸的合成; (d) 烟酸核糖核苷酸的合成; (e) 导至组氨酸的磷酸核糖-ATP 的合成; (f) 导至色氨酸的途径中磷酸核糖基-邻氨基苯甲酸的合成。
- 很可能由于小亚基的催化作用而使谷酰胺产生氨。然后新生的氨又与 CO<sub>2</sub> 的活化形式起作用, CO<sub>2</sub> 是由大亚基形成的。依赖于重碳酸盐的 ATP 酶活性说明这一活化的形式是羧基磷酸。这种碳酸-磷酸的混合酐与 NH<sub>3</sub> 发生的反应产生氨基甲酸, 然后氨基甲酸又与 ATP 反应产生氨甲酰磷酸。关于此酶作用机理的讨论, 可参看 C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms* (Freeman, 1979) pp. 150-154。

## 第24章

- (a) TTGATC; (b) GTTCGA; (c) ACGCGT; 和 (d) ATGGTA。
- (a) [T] + [C] = 0.46。  
(b) [T] = 0.30, [C] = 0.24 和 [A] + [G] = 0.46。
- 5.88 × 10<sup>3</sup> 碱基对。
- 1.0代后, 有半数分子是 <sup>15</sup>N-<sup>15</sup>N 而另一半是 <sup>14</sup>N-<sup>14</sup>N。2.0代后, 四分之一的分子是 <sup>15</sup>N-<sup>15</sup>N, 而其余四分之三是 <sup>14</sup>N-<sup>14</sup>N。在全保留复制中, 不会出现 <sup>14</sup>N-<sup>15</sup>N 杂交分子。
- FAD, CoA, NADP<sup>+</sup>。
- DNA 连接酶催化 DNA 链中磷酸二酯键的水解从而松弛了超螺旋 DNA。AMP 是攻击基因, 它附着在切点的 5' 磷酸基上。因为这反应是连接 DNA 片段的最后步骤的逆转, 它需要 AMP (参看图 24-32, 第 450 页)。
- 5'-GGCATAC-3'。

## 第25章

- (a) DNA 聚合酶 I 是单链, 而 RNA 聚合酶具有 α<sub>2</sub>ββ'σ 亚基结构。  
(b) 一个是脱氧核糖核苷三磷酸, 另一个是核糖核苷三磷酸。  
(c) 二者都是 5' → 3'。  
(d) DNA 聚合酶 I 有 5' → 3' 及 3' → 5' 核酸酶活性, 而 RNA 聚合酶无此活性。  
(e) DNA 聚合酶 I 是半保留, RNA 聚合酶是全保留。  
(f) DNA 聚合酶需要引物, 而 RNA 聚合酶不需要。

(g)二者都是通过焦磷酸水解而驱动。

- 5'-U A A C G G U A C G A U -3'
- R.NA的2'-OH具有分子内催化作用。用碱水解RNA时形成2'-3'环状中间物。
- 3-脱氧腺苷终止RNA合成,一个含有3'-脱氧腺苷的RNA链缺少3'-OH基。
- (a) pGCP, AGUp, ACp, Up, GUp 和C。  
(b) pGp, CAGp, UACUGp 和UC。  
(c) pGp, CAp, GP, UAp, CUGp 和UC。  
(d) pGp, CAp, GP, UP, AP, CUp, C。
- UAGCCUGAAUP。

## 第26章

- 亮-脯-丝-天冬-色-甲硫-。
- 多聚(亮-亮-亮-苏-酪)。
- (a)脯(CCC),丝(UCC),亮(CUC)以及苯丙(UUC)。或者,每个密码子的最后碱基可以是U。  
(b)亚硝酸引起这些C→U突变。
- (a)需要二个碱基改变。  
(b)精、天冬酰、谷酰、谷、异亮、甲硫或苏。
- (a)不,这是由于下面所示序列中第一个碱基的缺失以及在这个序列的末端其他碱基的插入-  
(b)-AGUCCAUCACUUA AU-
- 这三个顺序是:赖-终止;甲硫-精-;及-天冬酰-谷-。

## 第27章

- (a)否; (b)否; (c)是。
- 四条区带:轻,重,轻30S与重50S杂交以及重30S与轻50S的杂交。
- 约消耗799个高能磷酸键。在活化200个氨基酸时消耗400个,起始时用掉1个,形成199肽键时用掉398个。
- (b, c及f)为1型; (a, d及e)为2型。
- 最简单的假说是色氨酸tRNA及密码子CCA突变为与UGA互补的UCA。可是,对这改变了的tRNA的分析出现意外。它的反密码子并无改变,而却是在24位的G被A所取代。因此,线形碱基顺序中远离反密码子的残基可影响密码子识别的忠实性。
- 一种方法是合成一种带上活跃氨基酸类似物的tRNA。例如,溴乙酰-苯丙酰tRNA是一种大肠杆菌核糖体P位的亲和标记试剂。参阅H.Olen, M.Pellegrini, D.Eilat,和C.R.Cantor, *Proc.Nat.Acad.Sci.*70 (1973): 2799。
- 序列GAGGU是与16SrRNA的3'末端的五碱基顺序互补,它位于离AUG密码子5'侧几个碱基处。因此,这区域是蛋白质合成的起始信号。当G被A取代后,这个mRNA与16SrRNA的相互作用预料会减弱,因而降低了它作为起始信号的效率。事实上,这一突变导致了由这种mRNA所特定的蛋白质的合成速率降低10倍。对此问题的讨论,参阅J.J.Dunn, E.Buzash-Pollert, 及F.W.Studier, *Proc.Nat.Acad.Sci.*75 (1978): 2741。
- 二者都牵涉到水解反应: DNA聚合酶I的3'→5'核酸外切酶的作用以及一个氨基酸tRNA合成酶对一个错误的氨基酸-AMP中间物的水解。

## 第28章

- (a)在一个i<sup>-</sup>突变种中lac阻遏物缺失。因此,这个lac操纵子的蛋白质对此突变种是组成性的。  
(b)由于缺失irp阻遏物,因此irp操纵子的蛋白质对此突变种是组成性的。  
(c)阿拉伯糖操纵子在这突变种中未能表达,因为araC蛋白的P2形式是活化转录所必需的。  
(d)这突变种是溶解性而不是溶原性的,因它不能合成λ阻遏物。  
(e)这突变种是溶原性而不是溶解性的,因它不能合成转录时的正向控制因子——N蛋白。
- 一种可能性是i<sup>S</sup>突变种制造一个改变了的lac阻遏物,后者对诱导物几乎无亲和力,但对操纵基因有正常的亲和力。这种I<sup>dc</sup>阻遏物即使在诱导物存在下可与操纵基因结合并阻断转录。
- 这突变种有一种改变了的不能与阻遏物结合的lac操纵基因。这种增强基因称作O<sup>C</sup>(对操纵基因是组成性的)。
- 这突变种的cAMP结合蛋白(CAP)可能有缺陷或缺失。
- 携带λ原噬菌体的大肠杆菌细胞含有λ阻遏物分子,后者亦阻断其它λ病毒的速发早期基因的转录。
- (a)PRE转录本的翻译比PRM转录本的快5—10倍,因前者含有完全的蛋白质合成起始信号(如513页的讨论)。  
(b)PRE转录本的更有效的翻译使建立溶原性态所需的λ阻遏物分子剧增。对此讨论可参阅M.Prasch, K.Backman, Z.Humagun, A.Jeffrey, R.Maurer, B.Meyer, 和R.T.Sauer, *Science* 194(1976): 156。

# 附录A 物理常数和单位换算

物理常数的值

物理常数	符号	值
原子质量单位 (道尔顿)	amu	$1.661 \times 10^{-24} \text{ g}$
阿佛加德罗常数	$N$	$6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
玻耳兹曼常数	$k$	$1.381 \times 10^{-23} \text{ J deg}^{-1}$ $3.298 \times 10^{-24} \text{ cal deg}^{-1}$
电子伏特	eV	$1.602 \times 10^{-19} \text{ J}$ $3.828 \times 10^{-20} \text{ cal}$
法拉第常数	$F$	$9.649 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$ $2.306 \times 10^4 \text{ cal volt}^{-1} \text{ eq}^{-1}$
居里	Ci	$3.70 \times 10^{10} \text{ 蜕变 sec}^{-1}$
气体常数	$R$	$8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$ $1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$
勃朗克常数	$h$	$6.626 \times 10^{-34} \text{ J sec}$ $1.584 \times 10^{-34} \text{ cal sec}$
光在真空中的速度	$c$	$2.998 \times 10^{10} \text{ cm sec}^{-1}$

简写符号: C, 库仑 (coulomb); cal, 卡 (calorie);  
cm, 厘米 (centimeter); deg, 度 (degree Kelvin); eq,  
当量 (equivalent); g, 克 (gram); J, 焦耳 (joule);  
mol, 摩尔 (mole); sec, 秒 (second)。

转换因子

物理量	等值物理量
长度	$1 \text{ cm} = 10^{-2} \text{ m} = 10 \text{ mm} = 10^4 \mu \text{ m} = 10^7 \text{ nm}$ $1 \text{ cm} = 10^8 \text{ \AA} = 0.3937 \text{ inch (英寸)}$
质量	$1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg} = 10^3 \text{ mg} = 10^6 \mu \text{ g}$ $1 \text{ g} = 3.527 \times 10^{-2} \text{ 盎司 (常衡制)}$
体积	$1 \text{ cm}^3 = 10^{-6} \text{ m}^3 = 10^3 \text{ mm}^3$ $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 10^{-3} \text{ L} = 10^3 \mu \text{ L}$ $1 \text{ cm}^3 = 6.1 \times 10^{-2} \text{ 英寸}^3 = 3.53 \times 10^{-5} \text{ 英尺}^3$
温度	$\text{K} = \text{°C} + 273.15$ $\text{°C} = 5/9 (\text{°F} - 32)$
能量	$1 \text{ J} = 10^7 \text{ 尔格} = 0.239 \text{ 卡} = 1 \text{ 瓦特秒}$
压强	$1 \text{ torr} = 1 \text{ mm Hg (0 °C)}$ $= 1.333 \times 10^2 \text{ 牛顿/米}^2$ $= 1.333 \times 10^2 \text{ 帕斯卡}$ $= 1.316 \times 10^{-3} \text{ 大气压}$

数学常数

$\pi = 3.14159$
$e = 2.71828$
$\log x = 2.303 \log_{10} x$

标准词头

词头	符号	系数
kilo (千)	k	$10^3$
hecto (百)	h	$10^2$
deca (十)	da	$10^1$
deci (分)	d	$10^{-1}$
centi (厘)	c	$10^{-2}$
milli (毫)	m	$10^{-3}$
micro (微)	$\mu$	$10^{-6}$
nano (纳)	n	$10^{-9}$
pico (皮)	p	$10^{-12}$

## 附录B 元素的原子序数和原子量

名 称				名 称				名 称			
(英)	(汉)	符号	原子量	(英)	(汉)	符号	原子量	(英)	(汉)	符号	原子量
Actinium	锕	Ac	227.03	Hafnium	铪	Hf	178.49	Promethium	钷	Pm	145
Aluminium	铝	Al	26.9815	Helium	氦	He	4.0026	Protactinium	镤	Pa	231.04
Americium	镅	Am	243.06	Holmium	钬	Ho	164.930	Radium	镭	Ra	226.03
Antimony	锑	Sb	121.75	Hydrogen	氢	H	1.0099	Radon	氡	Rn	222.02
Argon	氩	Ar	39.948	Indium	铟	In	114.82	Rhenium	铼	Re	186.20
Arsenic	砷	As	74.9216	Iodine	碘	I	126.90447	Rhodium	铑	Rh	102.905
Astatine	砹	At	210.99	Iridium	铱	Ir	192.22	Rubidium	铷	Rb	85.47
Barium	钡	Ba	137.34	Iron	铁	Fe	55.847	Ruthenium	钌	Ru	101.07
Berkelium	锫	Bk	247.07	Krypton	氪	Kr	83.80	Samarium	钐	Sm	150.35
Beryllium	铍	Be	9.0122	Lanthanum	镧	La	138.91	Scandium	钪	Sc	44.956
Bismuth	铋	Bi	208.980	Lawrencium	𬾩	Lw	256	Selenium	硒	Se	78.96
Boron	硼	B	10.811	Lead	铅	Pb	207.19	Silicon	硅	Si	28.086
Bromine	溴	Br	79.909	Lithium	锂	Li	6.939	Silver	银	Ag	107.868
Cadmium	镉	Cd	112.40	Lutetium	镥	Lu	174.97	Sodium	钠	Na	22.9898
Calcium	钙	Ca	40.08	Magnesium	镁	Mg	24.312	Strontium	锶	Sr	87.62
Californium	锎	Cf	249.07	Manganese	锰	Mn	54.9380	Sulfur	硫	S	32.064
Carbon	碳	C	12.01115	Mendelevium	钔	Md	255.09	Tantalum	钽	Ta	180.948
Cerium	铈	Ce	140.12	Mercury	汞	Hg	200.59	Technetium	锝	Tc	98.91
Cesium	铯	Cs	132.905	Molybdenum	钼	Mo	95.94	Tellurium	碲	Te	127.60
Chlorine	氯	Cl	35.453	Neodymium	钕	Nd	144.24	Terbium	铽	Tb	158.924
Chromium	铬	Cr	51.996	Neon	氖	Ne	20.183	Thallium	铊	Tl	204.37
Cobalt	钴	Co	58.9332	Neptunium	镎	Np	237.05	Thorium	钍	Th	232.038
Copper	铜	Cu	63.546	Nickel	镍	Ni	58.71	Thulium	铥	Tm	168.934
Curium	锔	Cm	245.07	Niobium	铌	Nb	92.906	Tin	锡	Sn	118.69
Dysprosium	镝	Dy	162.50	Nitrogen	氮	N	14.0067	Titanium	钛	Ti	47.90
Einsteinium	铹	Es	254.09	Nobelium	锎	No	255	Tungsten	钨	W	183.85
Erbium	铒	Er	167.26	Osmium	锇	Os	190.20	Uranium	铀	U	238.03
Europium	铕	Eu	151.96	Oxygen	氧	O	15.9994	Vanadium	钒	V	50.942
Fermium	镭	Fm	252.08	Palladium	钯	Pd	106.40	Xenon	氙	Xe	131.30
Fluorine	氟	F	18.9984	Phosphorus	磷	P	30.9738	Ytterbium	镱	Yb	173.04
Francium	钫	Fr	223.02	Platinum	铂	Pt	195.09	Yttrium	钇	Y	88.905
Gadolinium	钆	Gd	157.25	Plutonium	钚	Pu	242.06	Zinc	锌	Zn	65.37
Gallium	镓	Ga	69.72	Polonium	钋	Po	208.98	Zirconium	锆	Zr	91.22
Germanium	锗	Ge	72.59	Potassium	钾	K	39.102				
Gold	金	Au	196.967	Praseodymium	镨	Pr	140.907				



# 附录C 某些酸的 $pK'$ 值

酸	$pK'$ (在 25°C)	酸	$pK'$ (在 25°C)
乙酸	4.76	乳酸	3.86
乙酰乙酸	3.58	顺丁烯二酸, $pK_1'$	1.83
铵离子	9.25	$pK_2'$	6.07
抗坏血酸, $pK_1'$	4.10	苹果酸, $pK_1'$	3.40
$pK_2'$	11.79	$pK_2'$	5.11
苯甲酸	4.20	酚	9.89
正丁酸	4.81	磷酸, $pK_1'$	2.12
二甲胂酸	6.19	$pK_2'$	7.21
碳酸, $pK_1'$	6.35	$pK_3'$	12.67
$pK_2'$	10.33	吡啶离子	5.25
柠檬酸, $pK_1'$	3.14	焦磷酸, $pK_1'$	0.85
$pK_2'$	4.77	$pK_2'$	1.49
$pK_3'$	6.39	$pK_3'$	5.77
乙铵离子	10.81	$pK_4'$	8.22
甲酸	3.75	琥珀酸, $pK_1'$	4.21
甘氨酸, $pK_1'$	2.35	$pK_2'$	5.64
$pK_2'$	9.78	三甲铵离子	9.79
咪唑离子	6.95	三(羟甲基)氨基甲烷	8.08
		水	14.0

## 附录D 标准键长

键	结 构	长度 (Å)
C—H	$R_2CH_2$	1.07
	芳族的	1.08
	$RCH_3$	1.10
C—C	烃	1.54
	芳族的	1.40
C=C	乙烯	1.33
C≡C	乙炔	1.20
C—N	$RNH_2$	1.47
	$O=C-N$	1.34
C—O	醇	1.43
	酯	1.36
C=O	醛	1.22
	酰胺	1.24
C—S	$R_2S$	1.82
N—H	酰胺	0.99
O—H	醇	0.97
O—O	$O_2$	1.21
P—O	酯	1.56
S—H	硫醇	1.33
S—S	二硫化物	2.05

## 附录E 生物化学中常用略语

A	腺嘌呤	HbO <sub>2</sub>	氧合血红蛋白
ACP	酰基载体蛋白	His	组氨酸
ACTH	促肾上腺皮质激素	Hyp	羟脯氨酸
ADP	腺苷二磷酸	IgG	免疫球蛋白G
Ala	丙氨酸	Ile	异亮氨酸
AMP	腺苷一磷酸	ITP	次黄嘌呤核苷三磷酸
cAMP	环腺苷酸	Leu	亮氨酸
Arg	精氨酸	Lys	赖氨酸
Asn	天冬酰胺	Mb	肌红蛋白
Asp	天冬氨酸	MbO <sub>2</sub>	氧合肌红蛋白
ATP	腺苷三磷酸	Met	甲硫氨酸
ATPase	腺苷三磷酸酶	MetHb	高铁血红蛋白
C	胞嘧啶	NAD <sup>+</sup>	尼克腺胺腺嘌呤二核苷酸(氧化型)
CDP	胞苷二磷酸	NADH	尼克腺胺腺嘌呤二核苷酸(还原型)
CMP	胞苷一磷酸	NADP <sup>+</sup>	尼克腺胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(氧化型)
CTP	胞苷三磷酸	NADPH	尼克腺胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原型)
CoA	辅酶A	Phe	苯丙氨酸
CoQ	辅酶Q	Pi	无机正磷酸
cyclic AMP	腺苷3',5'-环一磷酸	PP <sub>i</sub>	无机焦磷酸
Cys	半胱氨酸	Pro	脯氨酸
d	2'-脱氧核糖	PRPP	磷酸核糖焦磷酸
DIPF	二异丙基氟磷酸	RNA	核糖核酸
DNA	脱氧核糖核酸	mRNA	信使核糖核酸
cDNA	互补DNA	rRNA	核糖体核糖核酸
DNase	二硝基苯酚	tRNA	转移核糖核酸
DPN <sup>+</sup>	参看NAD <sup>+</sup>	RNase	核糖核酸酶
DPNH	参看NADH	Ser	丝氨酸
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸(氧化型)	T	胸腺嘧啶
FADH <sub>2</sub>	黄素腺嘌呤二核苷酸(还原型)	Thr	苏氨酸
FDNB	氟二硝基苯	TPN <sup>+</sup>	参看NADP <sup>+</sup>
fMet	N-甲酰甲硫氨酸	TPNH	参看NADPH
FMN	黄素单核苷酸(氧化型)	TPP	硫胺素焦磷酸
FMNH <sub>2</sub>	黄素单核苷酸(还原型)	Trp	色氨酸
G	鸟嘌呤	TTP	胸腺嘧啶核苷三磷酸
Gln	谷氨酰胺	Tyr	酪氨酸
Glu	谷氨酸	U	尿嘧啶
Gly	甘氨酸	UDP	尿苷二磷酸
GDP	鸟苷二磷酸	UDP-galactose	尿苷二磷酸半乳糖
GMP	鸟苷一磷酸	UDP-glucose	尿苷二磷酸葡萄糖
GTP	鸟苷三磷酸	UMP	尿苷一磷酸
Hb	血红蛋白	UTP	尿苷三磷酸
HbCO	一氧化碳血红蛋白	Val	缬氨酸

# 索引

(按汉语拼音字母顺序)

## A

阿比可糖	611
阿尔伯, W.	459
阿尔农, D.	334
阿夫泽利厄斯, B.	650
D-阿拉伯糖	215, 526
阿拉伯糖操纵子	526
阿雷托伊斯	663
D-阿洛糖	215
D-阿洛酮糖	215
阿脉(四氧嘧啶)	663
阿诺德, W.	332
阿司匹灵	666
阿特金森, D.	192
D-阿卓糖	215
埃(Å)	20
埃德加, R.	570
埃德尔曼, G.	619, 623
埃德曼, P.	16
埃德曼降解	16, 18
埃德蒙森, A.	626
埃勒-丹洛斯(Ehler-Danlos)	
综合症	149
埃默森, R.	332, 334
Ammonyx LO	167
D-艾杜糖	215
艾弗里, O.	435
艾姆斯, B.	497
艾姆斯试验	497
安德森氏疾病	286
安芬森, C.	24, 25
安密妥(5-乙基-5-异戊基巴比妥酸)	242
$\beta$ -氨基丙腈	153
氨基丙烯酸	314
$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)	698
氨基嘌呤	408

氨基多糖	155
氨基末端分析	16—17
5-氨基咪唑核苷酸	398
5-氨基咪唑-4-氨[基]	
甲酰核苷酰	384, 398
5-氨基咪唑-4-N-琥珀酸氨基甲酰核苷酸	398
5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸	398
2-氨基嘌呤	497
氨基酸	9—12
必需的	374, 381
芳香族的	11
分类	10—11
分析	15—19
非必需的	374
含硫的	11
合成	372—388
简写	11
碱性的	10
降解作用	311—326
结构	9—10, 12
绝对构型	10
羟基的	10
氢键形成能力	96
生物合成的前体	388—390
酸性的	11
碳骨架的命运	317
脱氨基作用	311—314
酰胺	11
修饰的	12
旋光性	10
氧化	311—326
D-异构体	604
pK值	29
脂肪族的	10
DNP-氨基酸	16
PTH-氨基酸	16
氨基酸顺序	

表皮生长因子的测定	668
15—19	
促肾上腺皮质激素的	30
核糖核酸酶的	25—26
肌红蛋白的	38
决定构型	24—26
溶菌酶的	104
血红蛋白的	43
血型糖蛋白的	170
胰高血糖素	653
胰岛素的	15
意义	15
组蛋白的	536
氨基糖	155
氨基肽酶	516
$\delta$ -氨基酮戊酸	389
$\delta$ -氨基酮戊酸合成酶	389
$\delta$ -氨基酮戊酸脱水酶	389
氨基酰位(A部位)	514
氨基酰-腺苷一磷酸	501
氨基酰-腺苷酸	501
氨基酰转移核糖核酸	500, 517
合成的杂交	506
氨基酰-转移核糖核酸合成酶	501—502
合成的杂交	506
$\beta$ -氨基异丁酸	412
氨甲蝶呤	408, 582
氨甲酰磷酸	401
合成	316
脉循环中	314
水解自由能	185
氨甲酰磷酸合成酶	316, 401
氨甲酰天冬氨酸	401
N-氨甲酰异丁酸	413
氨甲酰酯	794
铵离子	
氨基酸的合成中	373

氨基酸氧化中	311—314
氮来源的	372
参入进脉中	314—316
遗传性的代谢缺陷	316—317
昂温, N.	176
奥格斯顿, A.	227
奥丘阿, S.	296
奥塞瓦, F.	644
奥托, J.	138

## B

巴豆酰-A C P	304—305
巴尔蒂莫尔, D.	575, 583
巴赫, J.S.	150
巴克罗夫特, J.	53
巴克纳, H.	194
巴斯德, L.	194
巴斯德效应	420
八氢番茄红素	368—369
白喉毒素	556
白喉(棒状)杆菌	556
白细胞电泳照片	31
白血病治疗	408
摆动假说	506
半保留复制	440—441
半电池	236
半胱氨酸	11
合成	380
模型	2
氧化	317
半抗原	616
结合抗体的	616
半抗原决定簇	616
半乳糖	215, 522
代谢	288
作前体	80
半乳糖醇	289
半乳糖1-磷酸	288
半乳糖1-磷酸尿苷酰转移酶	288
半乳糖1-磷酸尿苷酰转移酶营养缺乏病	289
$\beta$ -半乳糖苷酶	522—523
半乳糖苷透(性)酶	522—523
半乳糖苷转移酶	287

半乳糖激酶	288
半乳糖血症	289
半乳糖脂	332
半缩醛	195
半缩酮	196
伴刀豆球蛋白A	14, 171
伴清蛋白基因	548
包涵素	561
胞苷一磷酸(CMP)	395
胞苷一磷酸(CMP)-N-	
乙酰神经氨酸	353
胞苷二磷酸(CDP)	396
胞苷二磷酸(CDP)-胆碱	351
胞苷二磷酸(CDP)-二	
酰基甘油	350
分子模型	5, 350
胞苷三磷酸	403
胞嘧啶	394, 433
胞嘧啶阿拉伯糖苷(阿糖胞苷)	582
胞嘧啶核苷	395
鲍德莱瑞, C.	368
鲍林, L.	20, 67, 75, 112, 620
贝尔纳, J.	43, 661
贝利斯, W.	652
贝壳类动物的毒害	690
贝内特, C.	627
贝尼希, 莱因霍尔德	53
贝尼希, 鲁思	53
被动运输	671
被膜, 病毒的	565
被膜小坑	361
本斯-琼斯, H.	621
本斯-琼斯蛋白	621
本泽, S.	493
苯丙氨酸	10—11
苯丙酮[酸]尿[症]	325
合成	381
羟化作用	324
氧化作用	324
苯丙氨酸羟化酶	324
苯丙酮[酸]尿[症]缺陷	325
苯丙酮酸	326
苯丙氨酸合成中	381

苯丙酮酸尿症	325—326
苯丙酸	294
苯丁酸	294
苯甲酸	294
苯乙酸	294
2-吡啶羧基甲磺	696
吡哆胺磷酸	312
吡哆醇	190, 312
吡哆醛磷酸	190, 312
催化的多样性	313
分子模型	312
磷酸化酶中	281
消旋酶中	605
荧光	82
转氨酶中	312—313
吡咯	33
吡咯烷酮环	37, 147
$\alpha$ -D-吡喃葡萄糖	196
吡喃糖	196—197
必需氨基酸	372
合成	381—388
必需脂肪酸	308
“编辑”(校对)	448—449
蛋白质合成中的	502
鞭毛	706—708
鞭毛蛋白	707
羊青霉素	608
变构蛋白	
核苷酸还原酶	405—406
磷酸化酶	280—281
磷酸果糖激酶	205
酶类	91—93
天冬氨酸转氨甲酰酶	403—405
血红蛋白	49—62
变构酶	101
协调模型	91—93
循序模型	93
变构相互作用	80
变视紫红质 I	702
变视紫红质 II	702
变性	25
表皮生长因子	668
RS 表示法	233
别嘌呤醇	413

冰	97	伯格,P.	294	操纵子	523
冰冻断裂电子显微术	167	伯格斯特罗姆,S.	665	阿拉伯糖操纵子	526
冰冻消蚀电子显微术	168	伯内特,M.	620,632	苯丙氨酸操纵子	529
丙氨酸	10	伯齐利厄斯,J.J.	15	乳糖操纵子	523—524
合成	375	博尼图斯,J.	226	$\lambda$ 噬菌体中的	529—532
氧化	317	卟啉		色氨酸操纵子	527—528
丙氨酸转氨酶	311	合成	389—391	组氨酸操纵子	529
丙二酸	89, 232	遗传性代谢缺陷	391	草酸	90
丙二酰CoA	301	卟啉症	391	草酰琥珀酸	219
丙二酰-ACP	304	补救途径		草酰乙酸	217
丙二酰转氨酶	304	核苷酸合成	399	氨基酸氧化中	318
丙糖激酶	288	磷酸甘油酯合成	396—397	柠檬酸循环中	218
丙酮	300	补体	619	葡萄糖异生作用中	265—266
丙酮酸	202	布赫纳,E.	194	C <sub>4</sub> 途径中	342
氨基酸降解中	317	布坎南,J.	396	侧链	10, 12
代谢命运	422—423	布朗,D.	544	O侧链	610—612
羧化作用	266	布朗,M.	361	侧向扩散	173
丝氨酸来源的	314	布朗利,G.	558	插入	579
糖酵解作用中	202—203	布朗斯泰因,A.	313	突变	496
C <sub>4</sub> 途径中	342	布洛,D.	121	插入序列(I S)	591,594
氧化脱羧作用的	222—226	布洛贝尔,G.	558	插入性失活	597
转变成乳酸	206	布洛克,K.	354	插入元件	594
转变成乙醇	206	布拉格,L.	44	查尔加夫,E.	439
转变成乙酰CoA	217—222	布雷切特,J.	465	茶碱	655
丙酮酸激酶缺乏	214	布里顿,R.	542	差值福里埃方法	105
丙酮酸羧化酶	265—267	布伦纳,S.	467,484	差异构酶	
丙酮酸脱氢酶复合物	222—225	不饱和脂肪酸的氧化	298	半乳糖代谢中	289
电泳照片	225	不变(C)区	621	戊糖磷酸途径中	256
控制	230	不等长对应体	570	缠绕(卷曲)	444
丙酰CoA	299—301	不对称反应	227	产生生长激素细胞的电泳	
氨基酸降解中	317	不对称性		照片	652
羧化作用	319	生物膜的	171	产电泵	673
丙酰CoA羧化酶	319	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> 运输系统的	174	肠肽酶	131
病毒	565—585	不可逆抑制	88	超变区	622,625
T2的电镜照片	467	不转录间隔	545	超缠绕DNA	444
类型	565			超极化	702
装配	566—572	C		超螺旋缠结	145
病毒粒子	565	蔡斯,M.	436	沉降系数	466
T4的电镜照片	565	残骸(影泡)	168	成核现象	71
波尔,C.	52	蚕	547	部位	151
波尔效应	52	苍术苷	247	成帽作用	633
机理	60	$\lambda$ 操纵基因	529—532	迟延早型基因	530
波贾克,R.	623	操纵基因部位	523—524	赤道取代基	197
波特,R.	618	$\lambda$ 噬菌体中的	530—532	D-赤藓糖	215
伯恩斯特尔,M.	544	乳糖操纵子中的	523—524	赤藓糖-4-磷酸	256

氨基酸合成中	381	催化能力	78	胆钙化甾醇	367
光合作中	341	催化亚基	657	胆固醇	161, 354
D-赤藓酮糖	215	催化中的畸变	107, 110—112	编号系统	362
充血性心力衰竭	676	错误抑止	509	胆汁盐的前体	359
p-重氮硝基苯半抗原	622			分子模型	355
重叠肽段	19			合成	355—358
重复的DNA顺序	542—546			合成的控制	360
重组	579			流动性的调节剂	174
重组膜	345			碳原子的来源	354
重组膜泡	677, 692			甾类激素的前体	363
重组的DNA	588—600			胆固醇代谢的紊乱	362
电镜照片	589, 590			胆固醇酯的显微照片	348
重组的DNA分子	595—600			胆碱	351, 691
出血症	137—138			磷酸甘油酯中	161
穿膜通道	681			乙酰化作用	691
传递介质, 视觉中	703			胆碱乙酰化酶	691
醇醛裂解	198			胆碱乙酰转移酶	691
醇脱氢酶	207			胆绿素	392
茨韦特, M.	68			胆色素原	390
雌二醇	366			胆酸钠	167
雌二醇受体	667			胆酰CoA	359
雌激素	363			胆汁盐	359
合成	365			cro蛋白	532
雌酮	363			G蛋白	656
次黄苷(肌苷)	54			蛋白多糖	155
次黄苷-胞嘧啶碱基对	507			蛋白激酶	657
次黄苷-尿嘧啶碱基对	507			蛋白酶在T4噬菌体装配中	570
次黄苷-腺嘌呤碱基对	507			蛋白水解酶	78—79
次黄苷酸	398, 399			recA蛋白质	591
次黄嘌呤	398			recB蛋白质	591
次黄嘌呤、鸟嘌呤磷酸核				recC蛋白质	591
糖转移酶	400			蛋白质	
缺乏症	413			氨基酸顺序	15
N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> -次甲四氢叶				氨基酸残基	9—12
酸	378, 397			变性与复性	25—26
次乙基亚胺	31			词源	15
clostripain	17			顺序测定	15—19
粗丝	635—641			功能	8—9
粗糙内质网	556—558			构象	19—27
电镜照片	557			结构水平	23
促肾上腺皮质激素				胨解作用	30
(ACTH)	30, 364			热力学稳定性	26
促肾上腺皮质(激)素	364, 665			肽键	12
促凝血球蛋白	139			提纯	13—14
催化基团	83				

折迭	26—27	地塞米松	667	读码框架	485
周期性结构	20—23	地中海贫血[症]	554	短杆菌肽A	680, 684
蛋白质合成	502—519	颠换	496	短杆菌肽S	518—519
氨基酰位(A位)	514	碘乙酰胺	88	对氨基苯磺酰胺	416
电镜照片	511	淀粉	286	对称[现象]	
翻译后的修饰	516	$\alpha$ -淀粉酶	286	病毒的	566
方向	511	$\beta$ -淀粉酶	286	蛋白质和核酸相互	
活化的中间产物	500—501	淀粉凝胶电泳	67	作用中的	480, 532
核糖体	509—519	电板	692	DNA的限制性切割中的	573
控制	555	电荷接力网络	125	对硫磷	695
起始	512—513	电化学势	671	对-三氟甲氧基苯胺	
起始信号	492	电泳	14, 67	基氧化物	248
起始因子	514	SDS-聚丙烯酰胺凝胶	166	阻遏物和操纵基因相互	
释放因子	516	血红蛋白	67—68	作用中的	524
肽键形成	515	电鳗	692	多巴(dopa)	698
肽酰位(P位)	514	电器官	692	多巴胺(dopamine)	698
延长	514	电鲷	692	多巴脱羧酶	698
延长因子	514	电鱼(electrophorus)	692	多重性末端	571
移位	515	电压感觉门	691	多发性骨髓瘤	620
抑制剂	517	电子传递	235—251	多核蛋白体	512
终止	516	电子传递链	243, 364	多核苷酸激酶	480
终止信号	492	电子密度图	35—36	多核苷酸磷酸化酶	486
终止因子	516	电子应变	115—116	多核糖核蛋白体	512
转移RNA	503—508	电子显微术象重建	175	多聚吡咯基甲烷	390
氯丝氨酸	416	冰冻断裂	167	多聚-L-苯丙氨酸	486
氧化的NADH	228	电子载体	186—187	多聚-L-赖氨酸	486
道尔顿	13	<i>Dichapetalum cymosum</i>		多聚-L-脯氨酸	145, 486
道尔顿, J.	13	(有毒的南非植物)	229	多聚尿苷酸(poly U)	485
德兰吉, R.	535	$\alpha$ -丁酮酸		多聚腺苷酸(poly A)尾	551
德雷尔, W.	627	半胱氨酸合成中	380	多瘤病毒	443, 581—582
德卢西亚, P.	450	异亮氨酸合成中	385	多肽合成	516—519
灯刷染色体	534	丁酰-ACP	305	进化	519
等电点	47, 67	丁泽斯, H.	511	多肽链	12
等位排斥	629	冬眠	249	多蒂, P.	468
低密度脂蛋白	360—362	动蛋白	649	多头绒泡菌	644
低密度脂蛋白受体	360—362	动力学		多烯烃	331, 701
低温酶学	105	酶的	83	多线染色体	550
低血糖效应	659	生物学过程的	3	多萜醇磷酸	559—560
滴定曲线	29	DNA重缔合的	542—543		
狄更斯, F.	254	动力学完整性	87		
迪克森, R.	249	动脉粥样硬化	362		
底物水平磷酸化	219	动作电势	688—689		
底物循环	268	豆蔻酸	292		
底物专一性	78—79	豆血红蛋白	373		
抵抗因子	593	毒扁豆碱	694		

## E

$\alpha$ -鹅膏蕈碱	
( $\alpha$ -amanitin)	549
鹅蕈菌(Amanita)	
phalloides)	549
恶性贫血症	320, 322



恶性体温过高	269	二十面体表面晶格	572	辅酶 A 中	188
厄特尔, M.	266	二十碳四烯酸	292, 666	泛酸单位	188
恩伯顿, G.	194	二十烷酸	292	范德瓦耳半径	97
恩格尔哈特, V.	637	二十二烷酸	292	范德瓦耳键	94, 96
儿茶酚胺	698	二十四烷酸	292	范德瓦耳接触距离	96
代谢中的作用	426	二糖-肽单位	606	范·尼尔, C.	333
儿茶酚-O-转甲基酶	698	二肽	12	防冷剂中毒	90
二级结构	23	构象	22	放大作用	
二甲基丙烯焦磷酸	357	二酰基甘油3-磷酸	160, 349	激素作用中	658
二甲基黄嘌呤	655	二硝基苯基氨基酸	16	视觉中	703
二甲基腺嘌呤	477	二硝基苯基化的牛血清清		糖原代谢中	284
二聚 NAG(di-NAG)	111	蛋白	616	血液凝块中	132
二硫键	11	二氧化碳		放射免疫测定法	664
还原	25	光合作用中	339-341	放射性同位素	227
裂解	19	柠檬酸循环中	222	放射自显影术	451
1,3-二磷酸甘油酸	89, 213	嘌呤生物合成中	396	放线菌素 D	478, 479
2,3-二磷酸甘油酸	53, 89, 213	葡糖异生作用中	265-266	放线菌素-脱氧鸟苷复合物	479
合成	213	戊糖磷酸途径中	254	非必需氨基酸	374
结合血红蛋白	59-60	与血红蛋白结合	60	合成	375-380
影响氧亲和性	53	脂肪酸合成中	302	非循环光合磷酸化	337
二磷酸甘油酸变位酶	89, 213	二异丙基氟磷酸(DIPF)		非极性相互作用	42
二磷脂酰甘油	161		88, 123	非竞争性抑制	89-90
二面角	20	解毒剂用	695	非连续基因	494-495
二羟苯羟乙醛	698	乙酰胆碱酯酶的抑制剂	695	非容许宿主	581
二羟苯乙胺	698	二异丙基磷酰-酶复合体	123-124	非血红素铁蛋白	220, 238, 335, 373
二羟苯丙氨酸	698				
二羟丙酮	195, 216	<b>F</b>		菲利普斯, D.	104
二羟丙酮磷酸	201	发酵	194	费弗尔, W.	706
甘油来源的	293	法拉第	237	费希尔, E.	83, 279
光合作用中	341	法呢基焦磷酸	358	肺炎球菌	
糖酵解中	201	分子模型	358	多糖外壳	434
二羟胆固醇	364	蕃茄红素	368	转化(作用)	434-436
二氢吡咯5-羧酸	319, 376	蕃茄丛缩病毒(TBSV)	572	R 和-S 型	434
二氢硫辛酸脱氢酶	223	翻译同时性运输	558	分辨率	35-36
二氢硫辛酸转乙酰酶	224	翻译(见蛋白质合成)		分隔基因(split gene)	495, 548
二氢硫辛酰胺	224	钒酸盐	673	分解代谢	349
二氢乳酸	401	反馈抑制	80	分解代谢途径	193
二氢乳酸酶	401	氨基酸生物合成中	384-388	分解代谢物基因激活剂	
二氢生物蝶呤	324	反密码子	483	(CAP)蛋白质	526
二氢生物蝶呤还原酶	324	反平行 $\beta$ -折叠片	22-23	分支酶	278
二氢叶酸	407	反式C-C键	174	分支酸	381-383
二氢叶酸还原酶	408	反向转运	677	芳香氨基酸的前体	381-383
二氢鞘氨醇	352	反转病毒	579-584	分子病	
二氢胸腺嘧啶	413	泛醌	239	定义	68
二十面体	566	泛酸	189, 410		

镰刀形细胞贫血症	65—72
分子病理学	73
分子翻转	173, 177
分子赋格曲	150
分子进化	75
分子模型	1—2
芬奇, J.	538
吩噻嗪环	479
粪卟啉原Ⅲ	390
蜂鸟	430
冯·基尔科, E.	285
冯·基尔科氏病	285
$\alpha$ -D-呋喃果糖	196
呋喃糖	196
弗莱明, A.	102
弗洛里, H.	608
弗伦克尔-康拉特, H.	566
氟二硝基苯 (FDNB)	16
氟氯溴乙烷	269
氟尿嘧啶	408
氟柠檬酸	229
5-氟脱氧尿苷	582
氟脱氧尿苷	408
氟脱氧尿苷酸	408
氟乙酸	229
氟乙酰CoA	229
辅基	32—33
辅肌动蛋白	636
辅酒化酶	194
辅酶A (CoA)	188
生物合成	409—410
辅酶Q (CoQ)	239
辅酶Ⅱ (NADP <sup>+</sup> )	186
辅酶Ⅰ结合位点	207
辅阻遏物	527
富兰克林, R.	437
富勒, B.	566
负氮平衡	375
负离子通道	169
负碳离子	260
复制叉	451—454, 540
复制蛋白质	456

## G

钙隔绝蛋白 (钙调节蛋	
-------------	--

白)	643, 656
钙化醇	190
钙离子	
对间隙接头的效应	685
对磷酸化酶激酶的效应	282
肌肉收缩中	642—643
凝块作用中	136—137
视觉中的	793
乙酰胆碱的释放中	692
运输	676
钙 (Ca <sup>2+</sup> ) ATP酶	
	642—643, 676
盖勒特, M.	455
干扰素	585
杆菌肽	560, 606
杆状病毒	577
肝	
代谢轮廓	424—426
代谢性相互交换	424
电镜照片	199, 417
钴胺素的来源	322
肝素	139, 155
甘氨酸	359
甘氨酸	10
卟啉合成中	389
合成	376—377
胶原中	143, 146
氧化	318
甘氨酸胺核苷酸	397
甘氨酸酪氨酸	114—117
甘氨酸-tRNA在细胞壁	
合成中	606
甘露糖	215
甘露糖 6-磷酸	562
甘油	159
进入糖酵解	293
磷壁酸质前体	607
磷酸甘油酯中	160
三酰基甘油来源的	293
甘油 3-磷酸	160, 184
甘油来源的	293
绝对构型	160
磷脂酸前体	349
水解自由能	185
甘油磷酸穿梭作用	245

甘油磷酸脱氢酶	246
甘油磷酸酰基转移酶	349
D-甘油醛	195, 216
分子模型	195
绝对构型	195
甘油醛 3-磷酸	201, 256
甘油醛 3-磷酸脱氢酶	202
催化机制	210—211
光合作用中	340
感觉系统	699—708
冈崎片段	453
高氨血	316
高半胱氨酸	379
甲基转移酶	379
转变成半胱氨酸	380
高尔, J.	544
高尔基器	560
高密度脂蛋白	360
高能键	185
高能磷酸化合物	184
高频率的重组细胞	592
高铁血红蛋白	33
高铁血红蛋白血症 [症]	73
睾酮	363
模型	667
戈尔德斯泰因, J.	361
革兰氏染色反应	603
革兰氏阳性细胞被膜	603—610
革兰氏阴性细胞被膜	610—613
革兰氏阴性细菌	603
革兰氏阳性细菌	603
格哈特, J.	404
斯林, D.	296
格林, M.	619
格林伯格, G. R.	396
格里菲思, F.	435
格罗斯, E.	17
格伦伯格-马纳戈, M.	486
根瘤菌属细菌	372
庚糖	610
共价修饰	80, 419
共线性	493
佝偻病	367
构象	
蛋白质的	19—27

多肽的	19—23	视觉中	699, 701—706	呋喃糖环型	196
核酸的	437—439, 465, 505	光合单位	332	开链型	196
膜的	173—175	光合磷酸化作用	334, 336—338, 344	$\alpha$ 和 $\beta$ 异头物	196
构象假说	242	光合细菌	332	果糖1-磷酸途径	288
咕啉环系统	321	光合作用	329—344	果糖1, 6-二磷酸	199
D-古洛糖	215	暗反应	339—344	光合作用中	341
钴	321	放出O <sub>2</sub> 的来源	333	葡糖异生作用中	265
钴胺素	320—322	光反应	333—338	糖酵解作用中	199—200
钴胺素在甲基化反应中的作用	321—322	基本方程式的发现	329—330	果糖1, 6-二磷酸酶作控制部位	420
骨	151	卡尔文 (Calvin) 循环	339—343	果糖6-磷酸	256
骨骼肌	635	能量转变的效率	341—342	光合作用中	341
骨骼模型	2	通式	333	葡糖异生作用中	265
骨髓瘤免疫球蛋白	621	ATP形成	336—338	糖酵解中	200
谷氨酸	11, 311	NADPH形成	335	果蝇染色体	442, 496
合成	373	叶绿体	331—332	果蝇卫星DNA	543
降解	311—312	光合作用暗反应	332, 339—344	<b>H</b>	
其它氨基酸的前体	376	光合作用光反应	332, 334—339		
转变成GABA ( $\gamma$ -氨基丁酸)	699	光合作用中的加氧酶	340, 343	哈伯, F.	372
谷氨酸 $\gamma$ -半醛	319, 376	光合作用中释放的氧	333	哈伯氏固氮法	372
谷氨酸脱氢酶	311, 373	光滑内质网的电镜照片	418	哈蚌毒素	690
谷氨酸脱羧酶	699	光呼吸作用	343	哈登, A.	194
谷氨酸转氨酶	311	光能营养生物	182	哈格曼因子 (一种血凝起因子)	139
GABA-谷氨酸转氨酶	699	光视紫红质	700, 703	哈里森, S.	572
谷胱甘肽	262—264	光受体	699—706	哈奇, M. D.	342
核糖核苷酸还原中	406	光系统 I	334—338	哈奇-斯莱克途径	342
谷胱甘肽还原酶	263, 406	组成	336	哈塔罗 (烟野), S.	644
谷酰胺	11	光系统 II	334—338	哈沃思投影	196
氮供体	386—387	组成	336	烩	180
合成	373—374	光学变换	35	汉森, J.	637
血纤维蛋白交联中	134	胱氨酸	13	旱石修, O.	324
氧化	318	氧化成磺基丙氨酸	19	汉斯莱特, K.	314
谷酰胺合成酶	373	胱硫醚	380	海洋海胆胚胎显微照片	546
电镜照片	371, 387	胱硫醚合成酶	380	毫米汞 [柱] 高 (mmHg)	50
控制	386—388	胱硫醚酶	380	豪罗威茨, F.	55
谷酰胺酶	318	鬼笔环肽	647	河豚毒素 (TTX)	690
固氮酶复合物	372—373	过碘酸希夫试剂	168	河豚鱼	690
固氮作用	372	过碘酸希夫 (PAS) 谱带	168	核不均-RNA	551
瓜氨酸	314, 315	过渡态的类似物	132, 609, 673	核苷单磷酸激酶	402
寡核苷酸合成酶	585	过甲酸	19	核苷二磷酸激酶	402
寡霉素	245	过氧化氢酶	411	核苷二磷酸糖	287
关键步骤定义	206	过氧化物酶体	343	核苷磷酸化酶	411
光		果糖	195, 215	核苷三磷酸	395
光合作用中	331—332	代谢	288	核苷酸	394—410

命名	394—396	53, 468	核酮糖1, 5-二磷酸	340, 346
生物合成	396—410	核糖核酸(RNA)聚合	羧化酶	340, 342
作用	394	酶	再生	340
核苷酸酶	411	电子显微照片	转变成果糖6-磷酸	340
核苷酸命名法	394—396	核糖核酸(RNA)指导的	核酮糖5-磷酸	255, 256, 341
核黄素	189		形成	255
核黄素5'-磷酸	410	核心酶	核小体	536—539
核膜	534	全酶	电镜照片	537
核仁	544	亚基结构	图解	538
核酸内切酶	480	依赖DNA的	核小体核心	538
DNA的限切中的	573	抑制剂	核心蛋白	156
核酸内切酶激活剂	584	DNA指导的	核心寡糖	559—560
$\beta$ -D-核糖	394, 465	真核生物型	核心颗粒	538
核糖醇作磷壁酸质的前体	607	核糖核酸酶S	核心糖化作用	560—561
核糖核苷	394	活性部位	合成代谢	349
核糖核苷酸还原酶	406—407	模型	合成代谢途径	193
核糖核酸(RNA)	465	核糖核酸酶T <sub>1</sub>	赫布拉, F.	457
合成	468—476	核糖核酸酶U <sub>2</sub>	赫希, A.	436
合成的控制	522—532	核糖核酸酶	赫克斯利, H.	637, 639
合成的RNA用作 mRNA	485	氨基酸顺序	赫克斯利, A.	637, 688
DNA合成中用作底物	453	变性	赫克特, S.	699
加工	476—477	底物结合	赫里奥特, R.	436
结构	465	复性	赫里克, J.	65
类型	466	搅乱了	赫佩尔, L.	654
裂解	476—477	核糖核酸肿瘤病毒	赫尔氏症	286
顺序排列	480	D-核糖5-磷酸	黑[色]素	326
修饰	476—477	光合作用中	黑脂膜	165
核糖核酸(RNA)病		核苷酸生物合成中	亨德森, R.	176
毒	574—578	核糖膜蛋白	亨德森-哈塞尔巴赫方程	29
Q $\beta$ 噬菌体	577—578	核糖体, 核蛋白体	横桥	636, 639—640
R 17噬菌体	577	氨基酰位(A位)	电镜照片	636
复制的方式	574	粗糙内质网	横纹肌	635
呼肠孤病毒	576	重建	横向扩散	173
狂犬病病毒	575	大肠杆菌的	红降	334
脊髓灰质炎病毒	574—575	电镜照片	红霉素	517
滤泡性口炎病毒	575—576	多核蛋白体	红膜肽(Spectrin)	168
核糖核酸(RNA)复制酶		功能	红细胞	31
	574, 577	起始复合物	电镜照片	31, 32
Q $\beta$ 噬菌体的	577	肽酰位(P位)	扫描电镜照片	31, 32
核糖核酸(RNA)合成酶		真核细胞的	红细胞膜	168, 169
	574, 577	核糖体核糖核酸	冰冻蚀刻电镜照片	168
核糖核酸(RNA)加工		基因	蛋白质	168
	550—552	核糖体结合部位	凝胶谱	166, 169
核糖核酸(RNA)-脱氧		核糖体受体蛋白	红细胞外壳(残骸)	672
核糖核酸(DNA)杂		D-核酮糖	呼肠孤病毒	576

呼吸的定义	235	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH)	254	黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)	187
呼吸控制	248	产生	254, 307, 335	反应	187, 238, 246, 296
呼吸酶集合体	235	胆固醇生物合成中	358	生物合成	410
载体顺序	238	光合作用中形成	335	磺化聚苯乙烯树脂 (Dowex-50)	16
$\alpha$ -糊精	286	类固醇的羟化作用中	364	磺基丙氨酸	19
$\alpha$ -糊精酶	286	脱氧核糖核苷酸生物合成中	405	回补反应	230, 267
胡德, L.	628	由苹果酸酶形成	307	混合功能加氧酶	364
$\beta$ -胡萝卜素	368	由戊糖磷酸途径形成	254	活化的CO <sub>2</sub>	266
琥珀酸	219	作用	186, 254	活化的二羟丙酮	261
琥珀酸-Q还原酶	239, 244	还原型辅酶Q (QH <sub>2</sub> )-细胞色素c	244	活化的甲基	379—380
琥珀酸脱氢酶	220	还原型辅酶Q (QH <sub>2</sub> )-细胞色素c还原酶复合物	239, 243	活化的能	81
竞争性抑制	88	还原型黄素腺嘌呤二核苷酸 (FADH <sub>2</sub> )	186	活化酶在蛋白质合成中	501
琥珀酸半醛	699	环AMP	279, 654	活化羟基乙醛	260
琥珀酸半醛脱氢酶	699	第二信使	655	活化域	129
琥珀酰胆碱	697	发现	653	活化载体	188
琥珀酰辅酶A	219	分子模型	658	活性部位	82—83
氨基酸降解中	319	合成	654	核糖核酸酶S的	7
柠檬酸循环中	219	饥饿信号	657	糜蛋白酶的	126
卟啉合成中	389	降解	283, 654	溶菌酶的	109
琥珀酰辅酶A合成酶	219	糖原代谢中	278—284	羧肽酶A的	114
互补试验	138	脂解作用调节中	293	霍尔登, J. B. S.	138
互补DNA (cDNA)	599	转录控制中	283	霍雷克, B.	254
花生四烯酸	392	作用	657	霍利, R.	503
花生酸	392	环AMP磷酸二酯酶	654	霍利德, R.	590
滑动丝模型	637, 641	环GMP磷酸二酯酶	704	霍利德模式	590
化能营养生物	183	环GMP在视觉中	704	霍乱毒素	658
化学感受器	706—709	环丙烷脂肪酸	176	霍乱弧菌 (Vibrio cholerae)	658
化学偶联假说	241	D-环结构	591	霍奇金, D.	43, 320, 661
化学渗透假说	241	环核苷酸级联反应在视觉中	704	霍奇金, A.	688
化学诱变剂	497	环氧鲨烯	358		
怀曼, J.	91	缓冲剂	29	J	
坏血病	148	黄苷酸	398	几丁质	103, 286
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)	186	黄体酮	363, 365	饥饿的代谢性适应	428
立体专一性	228	合成	365	肌氨酸	478
柠檬酸循环的	217	黄嘌呤	411	肌醇	160
糖酵解的	202	黄嘌呤氧化酶	411	肌动蛋白	636
氧化	246	黄素单核苷酸 (FMN)	238, 410	结合肌球蛋白的	638
脂肪酸氧化的	296			普遍存在	644
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)-Q	238			细丝	638
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)-Q	238, 244			形式, G和F形的	638

粘菌中的	644	肌原纤维	635	家族性高胆固醇血症	362
肌动球蛋白	638	基因转移势	184	荚膜多糖	434—435
肌钙蛋白复合物	642	基因移位	679	假尿苷	477
肌红蛋白 (Mb)	32—43	基因		贾德茨基, O.	674
氨基酸顺序	38	伴清蛋白的	548	甲苯磺酰-L-苯丙氨酸氨	
变性作用	42	核糖体RNA的	544—545	甲基酮	124
电子密度图	39	抗体的	626—631	甲醇中毒	91
复性	42	卵清蛋白的	495	$\beta$ -甲基巴豆酰CoA	323
构象	35—39	丝心蛋白的	547	$\beta$ -甲基巴豆酰CoA羧化	
$\alpha$ -螺旋含量	37	$\beta$ -珠蛋白的	494	酶	323
模型	37	<i>cI</i> 基因	530	甲基丙二酰CoA	
x射线分析	33—37	<i>i</i> 基因	523—524	氨基酸降解中	319
脱辅基肌红蛋白	42	突变型	523	遗传代谢缺陷	322
吸收光谱	39	<i>src</i> 基因	584	异构化作用	319
血红素	32—33	基因重排	588—600	D-异构体	320
血红素环境	38—42	基因重组	588—591	L-异构体	320
氧结合部位	38—39	基因间抑止	508	脂肪酸氧化中	320
肌红蛋白中的蛋白质折叠	42	激酶	657	甲基丙二酰CoA变位酶	320
肌激酶	183, 402, 644	激酶在病毒肿瘤发生学上	585	甲基钴胺素	379
肌浆	635	激素		$\gamma$ -甲基谷氨酸	709
肌球蛋白	636, 637, 644—646	对酶的作用	80	2'-O-甲基核糖	477
粗丝来源的	637	对乳糖合成的效应	287	甲基化作用在趋化性中	708
电镜照片	637	激素-受体复合物	662	甲基缬氨酸	478
非肌肉细胞中	644—647	激素作用	652—668	7-甲基鸟苷酸	552
结构	637	环AMP作为媒介体		3-O-甲基肾上腺素	698
结合肌动蛋白	638		653—658	N <sup>5</sup> -甲基四氢叶酸	377
裂解	638	激肽	138	甲硫氨酸合成中	379
普遍存在	644	激肽释放酶	138	$\beta$ -甲基戊烯二酰CoA	323
腺苷三磷酸酶(ATP		级联式调节	388	甲硫氨酸	11
酶)活性	637, 639	极低密度脂蛋白	360	合成	379
血小板中	644	电镜照片	425, 426	氧化	319
肌肉	635—649	极性头基团	162	甲硫氨酸脑啡肽	664
代谢轮廓	423—424	急性间发性卟啉症	391	甲硫氨酰-tRNA <sub>f</sub>	513
代谢性相互交换	424	急性胰腺炎	131	甲羟戊酸	355
电镜照片	8, 635, 636	吉本斯, P.	649	合成	355
光学显微照片	635	吉布斯, J.W.	180	甲酰-L-色氨酸	126
肌肉收缩	635—649	吉尔伯特, W.	460, 524	甲酰胺模型	2
控制	642—643	吉尔曼, R.	664	5-甲酰胺咪唑-4-氨甲酰	
力的产生	640—642	即地杂交	544	核苷酸	398
肌酸激酶	643	脊髓灰质炎病毒	574—575	甲酰甘氨酸核苷酸	397
肌小节	635	嵴	235	甲酰甘氨酸胺核苷酸	397
肌纤膜	635	己糖激酶	8, 199, 208	甲酰甲硫氨酸(fMet)	514
肌质网	643	己糖激酶缺乏	214	甲酰甲硫氨酸-tRNA <sub>f</sub>	514
凝胶图谱	166	加弗朗, H.	332	N <sup>5</sup> -甲酰四氢叶酸	377
运输Ca <sup>2+</sup>	676	加罗德, A.	325	N <sup>10</sup> -甲酰四氢叶酸	377

甲状腺素	389	纤维形成	150—152	解曲 (unwinding) 蛋白	455
钾离子		原胶原到胶原	149	$\alpha$ -金环蛇毒素	693
结合载体	682—683	胶原酶	153	紧缩DNA的	538
门	688—689, 691	胶原羟基化	143, 148	紧张型 (T型)	57
通透性	688—689	胶原三股螺旋	145—146	胰	153
间质	235	焦磷酸		精氨 [基] 琥珀酸	315
拣选糖蛋白	560	水解	277, 411, 501	精氨 [基] 琥珀酸合成酶	315
碱		水解自由能	185	精氨 [基] 琥珀酸 [裂解] 酶	
作质子受体	28	5-焦磷酸甲羟戊酸	356		315
碱基		焦磷酸酶	295	精氨酸	11
在核苷酸中	394	脚气病	226	氧化	318
碱基类似物	497	铰链		在脉循环中	314
碱基配对	437—439	肌球蛋白中	642	精氨酸酶	314
碱性磷酸酶	480	免疫球蛋白中	619	景天庚酮糖7-磷酸	256
碱性阳离子的性质	683	校正		景天庚酮糖1,7-二磷酸	341
减色性, DNA的	542	在蛋白质合成中	502	胍	461
减色效应	443—444	校正错误	448—449, 502	胍解作用	30
简并性	485, 491	酵母细菌的电镜照片	195, 206	竞争性抑制	88—90
摆动假说	506—507	接合体假设	483	静电键	94
箭头	640	接合作用	592—593	酒化酶	194
间隔顺序	494—495	电镜照片	587, 592	酒精发酵	207
免疫球蛋白中	630	接受甲基的趋化性蛋白质		SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	
间隙接头	670, 685	(MCP)	708—709		166
姜烯	368	杰尼, N.	620, 632	DNA聚合酶 I	
浆细胞	618, 632	$\theta$ 结构	451	电子照片	78
降解物阻遏	527	结构域	23	聚氧乙烯 <i>p</i> - <i>t</i> -辛基苯酚	167
交搭基因	494	结构域, 抗体中的	623	卷曲的螺旋 (coiled	
在DNA病毒中	494	结合铁氧还蛋白	335	coil)	141, 637
在RNA病毒中	677	结晶	34	绝对构型	
交换点 (crossover point)	243	结缔组织蛋白	142—150	氨基酸的	10
交联葡聚糖的商品名		介电常数	93	D-甘油醛的	195
(Sephadex)	13	节段柔性	619, 642	糖的	196, 215
胶束	163	解毒作用	364	均一的免疫球蛋白	620
胶原	142—152	解 [偶] 联剂	248		
氨基酸顺序	143	解链 (熔解)		K	
电镜照片	8, 142	胶原的	147	咖啡碱	655
构象	144—152	膜的	174	卡巴特, E.	622
坏血病中	148	脱氧核糖核酸 (DNA) 的		卡茨, B.	692
交联	151—152		443	卡尔文, M.	339
蝌蚪变态中的代谢	153	解链蛋白质	455	卡尔文循环	341
类型	142	解链酶 (helicase)	455	调节	342
模型	145—147	熔解温度 ( $T_m$ )	147	卡恩, R.	233
羟基化和糖基化	143—144	胶原的	147	卡诺夫斯基, M.	685
热稳定性	147	脱氧核糖核酸 (DNA) 的		卡波西, M.	457
糖单位	144		443	卡斯珀, D.	566





镰刀形红细胞血红蛋白 (HbS)		2-磷酸甘油酸	203	三酰基甘油合成中	349
氨基酸置换	68—69	3-磷酸甘油酸	203	RNA 顺序测定中	480
氨甲酰化作用	72	光合作用中	339—340	糖原代谢中	283
电泳迁移率	67	丝氨酸合成中	376	细胞壁合成中	606
反常溶解度	66	磷酸甘油酸变位酶	203, 275	磷酸葡萄糖变位酶	275
氰酸反应	72	磷酸甘油酸激酶	202	6-磷酸葡萄糖酸	255
纤维	66	磷酸甘油酯	159, 161	6-磷酸葡萄糖酸- $\delta$ -内酯	255
粘斑 (粘性碎片)	69	补救合成	351	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	255
镰刀形 [红] 细胞贫血症	65—72	从头合成	350	磷酸葡萄糖异构化酶	200
分子缺陷	66—70	磷酸酐键	182	3-磷酸羟基丙酮酸	376
抗疟疾保护作用	72	磷酸果糖激酶	200	磷酸丝氨酸	12, 80, 376
镰刀形细胞	65	控制	204	磷酸戊糖差向异构酶	256
临床报告	65	控制部位	420	光合作用中	341
遗传学	66	糖酵解的控制中	204—206	戊糖磷酸途径中	257
治疗	72	磷酸核糖变位酶	411	磷酸烯醇式丙酮酸	184, 203
$\lambda$ 链	622	5-磷酸核糖-1-焦磷酸		氨基酸合成中	381
$\kappa$ 链	622	(PRPP)	396	UDP-NAM 的合成中	605
pro- $\alpha$ 1 链	149	嘧啶核苷酸生物合成中	401	膜运输中	679
pro- $\alpha$ 2 链	149	模型	397	水解自由能	185
链霉素	517	嘌呤核苷酸生物合成中	396	糖酵解中	204
链丝菌属	478	组氨酸合成中	383	C <sub>4</sub> 途径中	342
链烯甘油醚	352	N-5'-磷酸核糖邻氨基苯		磷酸烯醇式丙酮酸羧基激	
链终止法	462	甲酸	383	酶	265
两性分子	162	5'-磷酸核糖-1-胺	397	磷酸乙醇酸	343
两性离子	9	N'-5'-磷酸核糖亚胺甲		磷酸原	643
亮氨酸	10	基-5-氨基咪唑-4-氨		磷酸转移酶系统	679—680
氧化	322—323	甲酰核苷酸	384	磷酸组氨酸	679
亮氨酸脑啡肽	664	磷酸-核酮糖激酶	341	磷酸基移位	198
量子式的释放	692	N'-5'-磷酸核酮糖亚胺		磷酸基转移	198
裂解酶定义	307	甲基-5-氨基咪唑-4-		N-(磷乙酰)-L-天冬氨	
邻氨基苯甲酸	381—383	氮甲酰核苷酸	384	酸 (PALA)	402
邻接组氨酸	38—39	磷酸化作用		磷脂	159
1-(邻-羧苯氨基)-1-脱		酶的控制中	231, 279—283	磷脂酶	352
氧核酮糖 5-磷酸	383	主动运输中	673, 676, 679	磷脂酶 A <sub>2</sub>	131
邻位 C—C 键	174	ATP 合成中	202, 203	磷脂酸	160, 349
磷壁酸质	607		235—248	CDP-二酰基甘油的前体	
磷酸吡哆醛 (见吡哆醛磷酸)		磷酸化酶激酶	279, 282		350
磷酸丙糖异构酶	201	磷酸化酶激酶磷酸酶	282—283	三酰基甘油的前体	349
磷酸胆碱	351	磷酸基团转移潜势	184—185	磷脂酰胆碱	160, 161
磷酸二酯酶	284, 654, 704	磷酸肌酸	184, 185	分子模型	162
磷酸二酯桥	434	磷酸甲羟戊酸	356	合成	351
4'-磷酸泛酸	410	磷酸精氨酸	643	自旋标记的	177
4'-磷酸泛酰半胱氨酸	410	3-磷酸-5-焦磷酸甲羟戊酸	356	磷脂酰丝氨酸	161
4'-磷酸泛酰硫基乙胺	410	磷酸酶		合成	351
磷酸 (分) 解 [作用] 定义	273	葡萄糖异生作用中	265	磷脂酰乙醇胺	161

合成	351
磷脂酰肌醇	161
林德, J.	148
林楠, F	296, 323
淋巴细胞	632
B型和T型	616
B-淋巴细胞	615
T-淋巴细胞	616
灵活性, 病毒装配中的	572
领头链	453
领先序列, <i>irp</i> mRNA上的	527
硫胺素焦磷酸 (TPP)	222, 260—261
丙酮酸脱氢酶中	222—225
分子模型	223
硫胺素缺乏	226, 261
硫醇蛋白酶	131
硫代半乳糖苷转乙酰酶	522
硫氢基缓冲剂	263
硫酸角质素	155
硫酸皮肤素	155
硫酸软骨素	155
硫酸乙酰肝素	155
硫辛酸	224
硫辛酰胺	222
丙酮酸脱氢酶中	222—225
模型	224
硫氧还蛋白	406
硫氧还蛋白还原酶	406
硫酯	210
硫脂类	332
流动镶嵌模型	173
流动性遗传元件	591—594
鲁丁, D.	164
鲁西谭努斯, Z.	325
六聚NAG (hexa-NAG)	107
六氢吡啶	461
六碳糖	195, 215
滤泡性口炎病毒	575
氯霉素	517
绿色硫细菌	333
绿藻	339
卵清蛋白基因	495
卵清蛋白mRNA	553

列宁格尔, A.	235, 294
罗斯曼, S.	679
螺旋	
$\alpha$ 螺旋	21—23
$\alpha$ 螺旋, 盘绕卷曲的	22, 141, 637
DNA双螺旋	437—439
螺旋去稳定蛋白	455
洛德·凯尔文	228
洛温斯泰因, W.	685
洛伊, A.	644

## M

吗啡	664
马戈里雅什, E.	250
马克赛姆, A.	460
马默, J.	468
马提马斯, C.	232
迈诺特, G.	320
迈耶, J.	330
迈耶霍夫, O.	194
麦克阿德尔氏病	285, 286
麦卡蒂, M.	435
麦康内尔, H. M.	177
麦克劳德, C.	435
麦克纳布, R.	708
麦胚凝集素	171
麦芽糖	286
麦芽糖酶	286
麦芽糖运输系统	612
牻牛儿基焦磷酸	358
牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸	368
莽草酸	381
毛地黄	676
毛地黄皂配基	675
毛地黄植物	676
帽, 在mRNA上的	551
梅塞尔森, M.	440
酶	78—99
变构酶	91—93
催化能力	78
活性部位	82—83
酶-底物复合物	81
米凯利斯-门顿模型	83—86
调节	79—80, 91—93

抑制作用	88—90
专一性	78—79
作用力	94—99
酶的词源	194
酶-底物复合物	81
核糖核酸酶中	7, 95
糜蛋白酶中	125—126
溶菌酶中	109
羧肽酶A中	114—116
作用力	94—99
酶多重性	385
酶的活化	79—80
酶的抑制作用	88
酶, B <sub>1</sub> 和B <sub>2</sub>	405
酶原 (proenzyme)	119
酶原 (zymogens)	79, 119—139
酶原粒 (zymogen granules)	119
酶指导的装配	570
镁卟啉	331
镁的作用	200
门顿, M.	84
锰在光合作用中	336
咪唑丙酮醇磷酸	384
咪唑甘油磷酸	384
4-咪唑酮-5-丙酸	319
糜蛋白酶	119—130
催化机理	122—127
底物结合	125—126
电荷接力网络	125
构象	120—121
四面体过渡态	126—127
同系酶	128—130
形式, $\alpha$ 和 $\pi$	120
专一性	121
糜蛋白酶原	119—120
活化机制	127—128
米尔斯泰因, C.	558, 621
米凯利斯, L.	82, 83, 84
米凯利斯-门顿模型	83—86
米凯利斯常数 ( $K_M$ )	84—87
测定	85
定义	85
数值表	86

意义	86	免疫球蛋白G	616	莫诺德, J.	91, 466, 523
米勒, O.	544	氨基酸顺序	622	墨菲, W.	320
米勒-鲁丁膜	165	F <sub>ab'</sub> 的构象	624	木瓜蛋白酶	131, 619
米切尔, P.	241, 242, 251, 678	活性片段	618	D-木糖	215
米酵霉酸	247	结构域	623	D-木酮糖	215
密度梯度沉降平衡	440—441	抗原结合部位	622	木酮糖5-磷酸	256, 257
密码子	484	可变区和不变区	621, 623, 626, 628	光合作用中	341
表	491	L链和H链	619	戊糖磷酸途径中	256, 257
密码子-反密码子配对	506—507	柔性	619	穆勒, P.	164
嘧啶	394	亚基结构	619	钼原子	372, 414
嘧啶二聚体	456—457	免疫球蛋白M	616	钼铁蛋白	372
着色性干皮病中的	457	免疫荧光显微镜技术	645	<b>N</b>	
嘧啶生物合成	401—404	免疫原	615	纳克曼索恩, D.	694
控制	403	缪勒-希尔, B.	524	纳洛克松(naloxone)	664
原子来源	401	蘑菇毒性	549, 647	钠离子(Na <sup>+</sup> )	
嘧啶降解	412	摩尔吸收系数	48	结合载体	681
免疫反应(性)	615—616	模板	439	通透性	688, 692
免疫反应中的载体	616	膜	158—175	钠离子门	688—691
免疫球蛋白	615—633	不对称性	173	钠通道	688—690
不均一性	617	可兴奋的(应激性)	688—709	NAD <sup>+</sup> (见烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)	186
超变区	622	膜本体蛋白	166—168	NAD <sup>+</sup> 结合部位	207
纯化	615—616	膜蛋白	165—175	NADH(见还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)	186
单克隆的	621	膜电势	241, 242, 671, 688, 692	NADH-Q还原酶	238, 243
电镜照片	615	膜流动性	173	NADP <sup>+</sup> (见烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)	186
定义	615	膜泡的主动运输	677	NADPH(见还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)	254
多样性的产生	627—631	膜运输	670—686	NAG(见N-乙酰葡萄糖胺)	
分类	626	不对称性	173	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATP酶	672—676
构象	624	Ca <sup>2+</sup> 的	676	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> 运输	672—676
合成	615, 616, 620	Na <sup>+</sup> 和K <sup>+</sup> 的	672—676	定向	672
活性片段	618	Na <sup>+</sup> 和糖的	677	机制	673—675
结合部位	617	磷酸转移酶系统	679—680	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATP酶中	672
基因	626—631	糖的	678—680	驱动葡萄糖运输中	677
进化	626	通过抗菌素的	680—684	抑制作用	675
可变区和不变区	621, 623, 626, 628	主动和被动的	671	脑代谢轮廓	423
克隆选择	632	作用	670	脑啡肽	664
mRNA	629	膜的粘度	172	脑苷脂	161, 352
柔性	619	膜周围蛋白	168	脑下垂体产生生长激素的	
特异性	615	膜脂	159—165	细胞	652
亚基结构	619	合成	349—358	内啡肽	664
免疫球蛋白A	626	膜的转变温度	174		
免疫球蛋白D	626	膜中的扩散	171, 177		
免疫球蛋白E	626	末端糖基化作用	562		
		末端转脱氧核苷酰酶	596		
		末端转移酶	596		

内含子	495, 548
内森斯, D.	459
内途径	132
$\beta$ -内酰胺环	608
内源因素	322
内质网的电镜照片	418
内酯酶	255
能荷	191—192
对磷酸果糖激酶的影响	205
对柠檬酸循环的影响	231
能量变化	3—4
能量产生	190
能量传递	333
能量贮存	424
能量偶联	182, 185, 251
能量转导	251
尼德杰克, R.	637
尼科尔森, G.	173
尼克酸 (niacin)	190
尼克酸 (nicotinate)	190, 409
尼克酸核苷酸	409
尼伦伯格, M.	485, 487
拟胆碱酯酶	697
逆转录酶	574, 582
粘性末端法	596
鸟氨酸	314
鸟氨酸转氨甲酰酶	315
鸟苷二磷酸 (GDP)	395
鸟苷三磷酸 (GTP)	395
不能水解的类似物	659
在视觉中	704
在蛋白质合成中的	514—515
在柠檬酸循环中	219
在葡萄糖异生作用中	268
鸟苷三磷酸不能水解的类似物	659
鸟苷三磷酸酶 (GTP酶)	
视觉中	705
激素作用中	656
鸟苷一磷酸 (GMP)	398
合成	398
鸟类骨髓母细胞瘤病毒	584
鸟类肉瘤病毒 (ASV)	
	580, 582—584
鸟嘌呤	394, 433

鸟嘌呤 胞嘧啶碱基对	438
鸟 [嘌呤核 苷	395
鸟 [嘌呤核] 苷酸结合蛋白	656, 704
鸟苷 5' [ $\beta, \gamma$ 亚胺基 ]	
三磷酸	659
鸟迁飞	429
鸟迁飞中的代谢	429
尿苷二磷酸 (UDP) 半乳糖	288
尿苷二磷酸 (UDP) 半乳糖 4 差向异构酶	289
尿苷二磷酸 (UDP) 葡萄糖	276, 392
糖原合成中	277
转变为 UDP-半乳糖	288
尿苷二磷酸 (UDP) 葡萄糖醛酸	392
尿苷二磷酸 (UDP) 葡萄糖焦磷酸	277
尿苷二磷酸 (UDP)-N-乙酰胞壁酸 (NAM)	605
尿苷二磷酸 (UDP) N-乙酰葡萄糖胺 (NAG)	605
尿苷三磷酸 (UTP)	403
尿苷一磷酸 (UMP)	395
尿苷酸	402
尿苷酰转移酶	388
尿卟啉原 I	390, 391
尿卟啉原 III	390
尿卟啉原 III 同合成酶	391
尿黑酸	325
尿黑酸尿症	325
尿黑酸氧化酶	325
尿刊酸	319
尿嘧啶	394, 465
尿嘧啶二聚体	457
尿嘧啶核苷	394
尿嘧啶 DNA 糖苷酶	458
尿囊素	411
尿囊素酶	412
尿囊酸	411
尿囊酸酶	412
尿素 (脲)	24
变性作用中	25, 619

尿素 (脲) 循环中	314
嘌呤降解中	411
尿素 (脲) 循环	314—316
反应	314
化学计算关系	315
遗传缺陷	316
与柠檬酸循环的联系	316
尿酸	411, 412
痛风中	413
尿酸酶	412
尿酸盐	413
脲酶	412
柠檬酸	218
不对称的命运	227
磷酸果糖激酶的抑制作用	205
作乙酰基载体	307
柠檬酸合成酶	218
柠檬酸裂解酶	307
柠檬酸循环	217—232
发现	231
反应	221
反应的类型	221—222
辅助因子	221—222
化学计算	220
控制	231
生物合成前体的来源	230
与尿素循环的联系	316
自由能变化	221—222
作用	420
柠檬酰辅酶 A	218
苜蓿	368
凝胶过滤色谱	13
凝块, 凝固	132—139
放大级联	132
$\text{Ca}^{2+}$ 和磷脂的作用	136
和血友病	137
内途径	132, 138—139
外途径	132, 138—139
维生素 K 的作用	135—136
血纤维蛋白	132—134
因子	138—139
凝血酶	79
对血纤维蛋白原的作用	133
与胰蛋白酶是同系物	134

专一性	134
凝血酶原被X <sub>a</sub> 因子活化	136
凝血酶原结构	135
牛磺胆酸	359
牛磺酸	359
扭曲数	445
纽伯格, C.	195
疟疾	72, 263
诺穆拉(野村), M.	510

## O

偶极离子	9
偶联因子	244

## P

帕杜, M.L.	544
帕克, J.	608
帕拉德, G.	235
帕马奎因(一种抗疟药)	262
帕纳斯, J.	195
排氮生物	314
排列顺序	
蛋白质的	15—19
DNA的	460—462
排尿酸生物	314
排尿素生物	314
盘绕	141, 637
庞波氏病	285
胚系假说	627
佩鲁茨, M.	33, 43
硼酸	141
蓬松的形成	550
pcpstatin	132
皮肤癌	457
皮质醇	365, 653
皮质铁氧还蛋白	364
皮质酮	365
F <sub>ab</sub> 片段	618
F <sub>c</sub> 片段	618
片足	644
嘌呤	394
嘌呤霉素	514, 517
嘌呤生物合成	396—400
补救途径	399
从头合成途径	397

各原子的来源	396
控制	400
嘌呤降解	411—412
拼接点, 碱基顺序的	552
拼接酶	495
贫血症	65-75, 262, 320, 322
平衡常数负对数(pK)	
氨基酸的	29
蛋白质中残基的	60
定义	28—29
平面双层膜	164
苹果酸	220
柠檬酸循环中	220
C <sub>4</sub> 途径中	342
苹果酸合成酶	310
苹果酸酶	307
苹果酸-天冬氨酸穿梭	246
苹果酸脱氢酶	220
在胞液中	307
葡聚糖(dextran)	286
葡萄糖醛酸	392, 435
葡萄糖异生	264—270
控制	268
能力学	268
特征性反应	265
途径	265
胰岛素的影响	659
作用	421
葡萄糖球菌蛋白酶	17
葡萄糖	195, 196, 199, 215
吡喃糖环型	196
ATP产量	247
乳糖转变生成的	522
α和β异头体	196
开链型	195
链型	196
模型	2, 196
糖酵解	194—201
形成	264
血液内	427
运输	677
抑制环AMP的合成	525
葡萄糖1-磷酸	273
水解自由能	185

糖原合成中	276—278
糖原降解中	273—275
葡萄糖6-磷酸	199
代谢命运	422
葡萄糖异生作用中	265
水解自由能	185
糖酵解中	199—200
糖原代谢中	275
戊糖磷酸途径中	254, 258
葡萄糖6-磷酸酶	
器官分布	276
营养缺乏病	285
葡萄糖6-磷酸脱氢酶	254
缺乏	262
作控制部位	420
葡萄糖1, 6-二磷酸	275
葡萄糖醛酸	392, 435
脯氨酸	10
合成	376
氧化	318
普里斯特利, J.	329
普利洛格, V.	233
普塔什恩, M.	531
普通的酸催化作用	110

## Q

碱糖尿病	323
七碳糖	195
齐姆, B.	442, 534
起始复合物	514
起始信号	
蛋白质合成中的	492, 513
RNA合成中的	472
起始因子	514
失活	585
起始因子eIF-2的控制	555
启动基因部位	472—473, 524, 526, 532
电镜照片	472
气体坏疽	153
千道尔顿(kdal)	13
千碱基(kb)	443
千碱基(kb)定义	443
前病毒	582
前感光视紫红质	702



构象	103—105	合成	305	森特-乔尔吉, 艾伯特	232, 638
活性部位	105—106	软脂酰CoA	352	森特-乔尔吉, 安德鲁	638
结合亲和力	111			沙克门, H.	404
专一性	102—103			沙门氏菌试验	498
溶菌性噬菌体	591	萨巴蒂尼, D.	558	鲨烯	357
溶酶体	132	萨林 (Sarin)	695	合成	357—358
电镜照片	354	萨瑟兰德, E.	653	作胆固醇的前体	358
泰-萨二氏症中	353	萨特, P.	649	杀虫剂	12
在 I-细胞病中	562	噻唑酮类似物	234	杀鼠灵 (沃发林, Warfarin)	135
溶血磷脂酸	349	噻唑烷环	608	山魈豆中毒 (胶原脆弱症)	153
溶原细菌	529, 579	三核苷酸	487	D-山梨糖	215
在生命周期中的阶段	529	三羟基羧酸	359	山萘酸	292
溶原途径	529, 530	三级结构	23	炳	179
溶原性, 由 $\lambda$ 噬菌体产生的	578—579	三甲基黄嘌呤	655	蛇毒	693
溶组织梭菌	153	三联体	484	蛇毒磷酸二酯酶	480
肉碱	295	三碳糖	195, 215	x射线晶体学	33—37
ROUS肉瘤病毒	579	三酰基甘油	291, 292—293	1-磷酸-3-磷酸甘油酸	211
乳多孔病毒	580	合成	349	磷酸酯	211
乳糜微粒	360	作能量贮库	292	神经传递介质	691, 698
乳清蛋白	287	三酰基甘油合成酶复合物	349	神经冲动	688—690
乳清酸	401	三-N-乙酰葡萄糖胺 (tri-NAG)		神经毒气	124, 695
乳清酸核苷酸	401		105	神经毒素	693
乳清酸核苷酸焦磷酸酶	401	与溶菌酶的结合	106	神经肌肉接头	691
乳酸	207, 269	Triton X系列	167	神经节苷脂类	162, 353
乳酸脱氢酶	207, 269	桑格, F.	15, 462, 659	缺陷性损伤	353
乳糖	80, 287, 522, 678	桑格试剂	17	神经节苷脂 GM <sub>1</sub>	353
合成	80, 287	色氨酸	11	神经节苷脂 GM <sub>2</sub>	353
模型	288	合成	381—382	神经节苷脂 GM <sub>3</sub>	353
运输	678	作辅阻遏物	527	神经生长因子 (NGF)	9, 668
乳糖合成酶	80, 287	色氨酸操纵子	527	神经酰胺	352
乳糖酶	287	色氨酸合成酶	382	合成	352
乳糖操纵基因	525	共线性研究	493	作神经节苷脂的前体	353
乳糖操纵子	523	突变	493	作鞘磷脂的前体	353
环AMP的作用	525	荧光	82	肾上腺素	278, 389, 698
mRNA顺序	525	色氨酸 mRNA	527	代谢中的作用	426
乳糖透酶	678	色氨酸阻遏物	527	$\beta$ -肾上腺素能受体	656
乳糖-质子同向转运	678	色觉	705	肾上腺性征异常	366
乳糖阻遏物	523—524	色盲	705	生命周期	541
阮来镍	505	色谱 (层析)		生热	249
软骨病	367	亲和色谱法	14	生色团	700
软骨蛋白多糖	156	凝胶过滤	13	生糖氨基酸	317
软脂酸	159, 292	离子交换	14	生酮氨基酸	317
ATP产率	298	肽段的	68	生物过程的动力学	2—3
分子模型	160	瑟西迪德斯	615	生物合成的前体, 来自柠	
		森尼比叶, J.	330	檬酸循环的	230

生物化学的定义	1	视黄醇	190	脂双层中	162
生物膜	158—176	视黄醇脱氢酶	701	鼠李糖	611
不对称性	170—174	视黄醛	700—702, 706	刷状缘	646
重组	166	11-顺异构体	6, 700	双层	162—165
动力学和流动性	173	全反异构体	700	双丁酰环AMP	655
共同特征	159	异构化作用	701	双分子片	162
和冰冻蚀刻电镜照片	168	视黄醛异构酶	701	双加氧酶	324
膜蛋白	165—173	视觉	699—706	双链RNA, 在干扰素作用中	
膜脂类	159—161	视网膜视杆细胞的纤毛	699—700		585
融合	172			双羟香豆素	136
通透性质	164—165	视锥(cones)	699, 705—706	双脱氧类似物	462
脂双层	162—165	视锥视蛋白	706	双糖	286
作用	158—159	视紫红质	700—704	衰减基因	527
生物素	266	噬菌体(细菌的)		衰减作用	528
丙酮酸羧化酶中	266—267	F 2	577	水	97—99
受抗生物素蛋白的抑制作用		$\lambda$	529—532, 578—579	对非极性相互作用的效应	
	271	MS2	577		98
乙酰CoA羧化酶中	302	mu	591	对极性相互作用的效应	98
作用机理	266	P22	612	模型	2
生物素羧化酶	303	Q $\beta$	577—578	水合茛三酮	16
生物素羧基载体蛋白	303	RNA	577—578	水合自由能	683
生育酚	190	T 2	436	水解作用	78
生长激素	652	T 4	568—571	水杨酸	666
生长激素释放抑制因子	599	$\varphi$ X 174	442	顺磁性的类似物	177
生长因子蛋白质	667	$\lambda$ 噬菌体	529—532, 578—579	4-顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸	324
施皮格尔曼, S.	468	电镜照片	578	顺-反异构作用	701
十二烷基二甲胺氧化物		相互重组	579	顺乌头酸	218
(DDAO)	167	环状DNA的	578	顺式双键	174
十二烷基磺酸钠(SDS)	166	溶原性	578—579	顺-11-十八碳烯酸	308
十八碳二烯酸	292	遗传图谱(基因图谱)	530	顺序反馈控制	385
十八碳三烯酸	292	在DNA克隆中	595, 597	顺序分析仪	19
十八碳烯酸	292	在控制转录中作用	529—532	丝氨酸	10
十八烷酸(硬脂酸)	292	T 4 噬菌体的形态发生	570	合成	376
十六烷酸(软脂酸, 棕榈酸)		噬菌体转变	612	键合糖	170
	292	适应		磷酸甘油酯中	160—161
十四烷酸(豆蔻酸)	292	趋化性中	708	脱氨作用	314
史密斯, E.	250, 535	视觉中	702	氧化作用	317
史密斯, H.	459	释放因子	322, 516	丝氨酸蛋白酶	124
试验菌株	498	收缩力	640—642	同系性	128
视蛋白(opsin)	700	收缩温度	147	丝氨酸脱水酶	314
视杆(rods)	699—704	手性	228	丝心蛋白	547
视杆膜的凝胶图谱	166	RS表示法	233	斯库, J.	672
视杆细胞	699—704	受体的内吞作用	361	斯莱克, C. R.	342
电镜照片	418, 602, 699	疏水单位	162	斯内尔, E.	313
视杆外段	699—700, 702	疏水性相互作用	98	斯塔尔, F.	440



斯塔林, E.	652	活性部位	114—116	N	394
斯坦纳, D.	660	诱导适合	114—115	糖基-酶中间体	112
斯特劳德, R.	129	专一性	113	糖尿	663
斯特罗门杰, J.	608	羧肽酶原	118	糖尿病	663
斯托依肯尼鄂斯, W.	344	锁链赖氨素	155	糖皮质激素	363, 667
斯图尔特因子	139	锁钥模型	83	合成	365
四吡咯	33			糖肽转肽酶	607
四碘甲腺原氨酸	389			糖酵解	194—214
四环素	517			ATP 产生	203—204
四聚-NAG的内酯类似物	111			词来源	194
四氢生物蝶呤	324			反应	205
四氢叶酸	377, 407			反应类型	198
携带的一碳单位	377—378			化学计算	203—204
衍生物的转变	378			控制	205—206
四碳糖	195, 215			热力学	205—206
四氧嘧啶	663			遗传缺陷	214
松弛的DNA	445			作用	420
松弛型(R型)	57			糖酵解中间物的浓度	212
苏氨酸	10			糖原	272—285
键合到糖上	170			贮藏疾病	285
脱氨作用	314			电镜照片	272
氧化	319			合成	276—278
转变成异亮氨酸	385			结构	272
苏氨酸脱氨酶	80, 385			颗粒	272
苏氨酸脱水酶	314			控制	278—284
苏格拉底(Socrates)	633			降解	273—274
D-蔗糖	215			作用	272
速发早期(即早期)基因	530, 569			糖原代谢的作用	421
缩合酶	218			糖原合成酶	277, 282
缩醛磷脂	352			a型	282
缩醛磷脂酰胆碱	352			b型	282
索修尔, T.	330			控制	283
酸	28			糖原合成酶磷酸化酶	284
酸碱平衡	28			糖原磷酸化酶	273—274
酸性蛋白酶	131			结构	280—281
随从链	453			控制	280, 283
随机移动, 在趋化性中	708			磷酸化酶a	279
髓磷脂	690			磷酸化酶b	279
羧蛋白酶	131			糖原降解中的转移酶	274
$\gamma$ -羧基谷氨酸	12, 135			糖脂	161, 171
羧基生物素的分子模型	267			特明, H.	582, 583
羧肽酶A	113—116			梯度的感觉	708
催化机理	115—116			体细胞超突变假说	627
电子应变	113, 115—116			体细胞重组假说	627
构象	113			天冬氨酸	11
		T			
		塔崩(tabun)	695		
		塔尔梅奇, D.	632		
		D-塔格糖	215		
		D-塔罗糖	215		
		塔特姆, E.	592		
		胎盘传导部位	619		
		肽			
		重叠	19		
		构象	19—20		
		裂解的	17—19		
		糜蛋白酶解的	19		
		水解	16		
		顺序分析	15—19		
		胰蛋白酶解的	19		
		肽基	20		
		肽键	12		
		水解	78		
		肽酰位(P位)	514		
		肽酰转移酶	515		
		泰勒, E.	639		
		泰-萨氏病	353		
		弹性蛋白	154		
		弹性蛋白酶	119, 128		
		与糜蛋白酶的同源性	128		
		弹性蛋白酶原	119		
		碳酸酐酶	78		
		糖	195, 286—289		
		糖蛋白	169—171		
		合成	557—562		
		拣选	560—562		
		胶原	144		
		糖蛋白中的寡糖	559		
		糖苷键			
		$\alpha$ 和 $\beta$	103		
		$\alpha$ -1,4-	272		
		$\alpha$ -1,6-	272		
		$\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)	103		

合成	375	酮糖-醛糖异构化作用	255	柠檬酸循环中	218—220
嘧啶生物合成中	401	酮体	299, 429, 663	糖酵解作用中	202, 207, 210
嘌呤环中	314	2-酮-3-脱氧辛酸(KDO)	611	戊糖磷酸途径中	254
氧化	318	$\alpha$ -酮戊二酸	218, 311	氧化磷酸化中	238, 246
天冬氨酸转氨甲酰酶	401, 403	氨基酸氧化中	311, 317, 318	脂肪酸合成中	303
$\beta$ -天冬氨酸磷酸	673	胶原羟基化作用中	144—145	脂肪酸氧化中	296
天冬酰胺	11	柠檬酸循环中	218—219	脱水酶	314
合成	375	$\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物	219, 222	脱水作用	198
与糖联结	171	酮酰CoA	296	脱羧作用	
氧化	318	$\beta$ -酮酰-ACP-还原酶	304	丙二酰CoA的	304
甜菜碱	380	酮亚胺	313	丙酮酸的	217
调节基因	523—524	$\alpha$ -酮异己酸	322	草酰乙酸的	267
调节基因表达	523—532	痛风	413—414	6-磷酸葡萄糖酸的	254
调节亚基	657	透酶	678	$\alpha$ -酮戊二酸的	219
菇类	368	透明质酸	155	异柠檬酸的	218
铁蛋白	8	透析	13	脱酰胺-NAD <sup>+</sup>	410
铁蛋白共轭体	171	突变	493, 496—498	脱酰作用	123, 126
铁硫蛋白(FeS蛋白)	220, 335	pol突变株	450	脱腺苷酰酶	387
铁硫复合物	238	dnaE突变株	450	3-脱氧阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸	381
分子模型	238	突触	691	脱氧胞苷	395
铁硫化物丛	372	突触后膜	691	$\beta$ -D-2-脱氧核糖	395
铁氧还蛋白	335	突触间隙	691	脱氧核糖核苷	395
光合作用中	335	突触泡	691	脱氧核糖核苷酸的合成	405
固氮作用中	372—373	突触体(synap to somes)	691	A-脱氧核糖核酸(A-	
铁氧还蛋白-NADP还原酶	335	突触体(synaptic body)	700	DNA)	439
铁原卟啉IX	32	吐温80(Tween 80)	693	B-脱氧核糖核酸(B-	
铁原子的运动	57—58	蜕化素	550	DNA)	439
TnC	642	托(相当于1 mmHg)	50	脱氧核糖核酸(DNA)	433—462
TnI	642	托里塞里, E.	50	半保留复制	440—441
TnT	642	托内加瓦(利根川), S.	627, 628	不转录的间隔	545
通道形成体	681	脱辅基蛋白质	33	超缠绕	445
通透性		脱辅基肌红蛋白	42	重复顺序	542
脂双层的	164—165	脱乙酰基酶	516	重组	588—600
通透系数	165	脱磷酸辅酶A	410	大小	442
同功酶	270	脱敏作用	404, 692, 708	单链	442
同向效应	93	7-脱氢胆固醇	367	电泳照片	5
同向转运	677	脱氢抗坏血酸	148	低色性	542
同种异型部位	621	5-脱氢奎尼酸	381	放射自显影术	451, 464
铜缺乏	154	5-脱氢莽草酸	381	Cot分析	543
酮病	429	脱氢酶		复制	451
$\alpha$ -酮丁酸	314	氨基酸合成中	373	复制蛋白	456
$\beta$ -酮硫解酶	297, 301	氨基酸降解中	311	在果蝇中的大小	535
$\alpha$ -酮酸在转氨作用中	314	丙酮酸氧化中	222—226	x光衍射图象	437
酮糖	195, 215	光合作用中	336		

合成	446—458	在DNA克隆中	596	微管蛋白	648
克隆	595—600	脱氧核糖核酸螺旋的拓扑学		微球菌 ( <i>Micrococcus</i>	
核酸酶的作用	449—458		445, 455	<i>Lysodeikticus</i> )	102
环状	444	脱氧核糖核酸酶	569	微绒毛	677
甲基化	573	脱氧核糖核酸(DNA)的		微丝	645
碱基	433	浅沟	440	微体	343
碱基比	438	脱氧核糖核酸(DNA)的		围篱铁卟啉	40
碱基配对	437—439	深沟	440	韦伯斯特, D.	367
解链(熔解)	443, 542	脱氧核糖核酸(DNA)的		韦恩, J.	666
聚合酶 I	79; 446, 448, 458	双螺旋	437—439	韦斯特海默尔, F.	228
聚合酶 II 和 III	450	脱氧核糖核酸(DNA)的		维尔尼克-柯尔萨科夫综合症	
连接	596—597	退火	443		261
连接酶	449	脱氧核糖核酸文库	598	维多利亚(Victoria)女王	
裂解	596—597	脱氧核糖核酸旋转酶(DNA			137
模型	437—440	gyrase)	455	维管束鞘细胞	342
命名	433—434	脱氧核糖核酸引起的转化作用		维诺格拉德, J.	444
起动子部位	472—473		434—436	维生素	
A式的	439	脱氧鸟苷	396	水溶性的	189
B式的	439	脱氧尿苷酸(dUMP)	407	脂溶性的	189
C式的	599	脱氧腺苷	396	作辅酶	189
Z式的	439	5'-脱氧腺苷钴胺素	321	维生素A	189
图解图	433	甲基丙二酰CoA变位酶中		缺乏	701
退火	542—543		321	维生素B <sub>1</sub> (硫胺素)缺乏	226
沃森-克里克双螺旋		模型	321	维生素B <sub>2</sub>	189
	437—439	脱氧胸苷	396	维生素B <sub>6</sub>	189, 190, 312
限制作用	459, 573	脱氧胸苷酸(dTMP)	407	维生素B <sub>12</sub>	320—322
小牛胸腺的	543	脱支酶	274	维生素D的合成	367
小鼠卫星	543	唾液酸	353	维生素D <sub>2</sub>	190
形式	439	拓扑异构酶	445, 455	维生素D <sub>3</sub>	367
修复	456—458			维生素E	190
真核生物染色体中的				维生素K <sub>1</sub>	190
	534—548			维生素K <sub>2</sub>	135, 368
转化作用	434—436	瓦基尔, S.	301	尾纤维	569
作模板	439, 468—469	瓦杰罗斯, P.R.	303	胃蛋白酶	119, 132
脱氧核糖核酸聚合酶 I 的		瓦伦丁, R.	619	胃蛋白酶原	119, 132
电镜照片	78	外显子	495, 548	卫星DNA	543
脱氧核糖核酸(DNA)聚		外源凝集素	170—171	温和噬菌体	529
合酶		外罩小泡	561	文内斯兰德, B.	228
I	79, 446, 448	晚期基因	530, 569	稳态	84
II	450	网织红细胞	511, 555	沃伯格, O.	195, 254
III	450	威尔金斯, M.	437	沃尔德, G.	701
RNA指导的	583	威尔逊, I.	696	沃尔什, D.	657
真核生物的	541	威廉斯, R.	566	沃森, J.	437, 566
脱氧核糖核酸连接酶(DNA		威瑟林, W.	676	沃森-克里克双螺旋	437—439
ligase)	449	威特科普, B.	17	乌巴因	675
		微管	648		

乌头酸酶	218
乌头酸酶的抑制作用	229
无活菌素	682
无效循环	269
无意义突变	508
五聚甘氨酸桥	604, 607
五碳单位	368
五碳糖	195, 215
伍德, W.	570
戊糖磷酸途径	255—264
反应表	257
非氧化支路	255—257
控制	257—258
氧化支路	255
组织差异	259
作用	421
<b>X</b>	
希尔, R.	333
希尔反应	333
希尔反应中的高铁氰化物	333
希尔反应中的亚铁氰化物	334
希尔图	51
希尔系数	51
希夫碱	261
吡哆胺磷酸的	312
吡哆醛磷酸的	312
胶原交联中	152
醛缩酶中	209
色氨酸合成中	382
视紫红质中	701
弹性蛋白交联中	154
转氨酶中	312—314
3-烯醇丙酮酰莽草酸-5-磷酸	381
烯醇化阴离子	209
烯醇磷酸酯	212
烯酰CoA	296—298
烯酰CoA水合酶	297
烯酰-ACP-还原酶	304
西德纳姆, T.	413, 664
吸光率	48
吸收光谱	
肌红蛋白和血红蛋白的	39
色感受器的	705

视紫红质的	701
叶绿素a和b	331
细菌的滚转	707—708
细菌的趋化性	706—708
细菌视紫红质	175, 344
细菌细胞壁	603—614
被溶菌酶裂解	102—103
电镜照片	102, 603
对青霉素的作用	608—610
功能	603
合成	604—605
和交联	607
结构	603
I-细胞病	562
细胞到细胞的通道	685
细胞间识别	171
细胞色素类	239—243
336—337	
细胞色素(a + a <sub>3</sub> )	239
血红素基团	239
细胞色素b	239
细胞色素c	239, 243, 249—251
结构	249
进化	250
血红素基团	239
细胞色素c <sub>1</sub>	239
血红素基团	239
细胞色素c氧化酶	241, 244
电镜照片	241
细胞色素P <sub>450</sub>	364
细胞色素氧化酶	240
细胞松弛素B	647
细胞游动性	644
细菌叶绿素-蛋白质复合物	335
细丝	635—641
纤毛(cilia)	649
纤毛(pilus)电镜照片	587
纤维素	286
纤维素酶	286
先传导通道	689
先前白蛋白的信号顺序	558
先天性肾上腺增生	366
酰胺键	12
酰化作用	126

酰基-丙二酰-ACP-缩合酶	304
酰基辅酶A(酰基CoA)	188, 294—296
酰基CoA-胆固醇酰基转移酶	362
酰基CoA合成酶	294
酰基CoA脱氢酶	296
酰基肉碱	295
酰基-酶中间体	122—123
青霉素中的	609
糜蛋白酶中的	126
乙酰胆碱酯酶中的	695
酰基砷酸盐	211
酰基腺苷酸	294
氨基酸活化中	501
脂肪酸活化中	294
N-酰基鞘氨醇	352
酰基载体蛋白(ACP)	303
限制酶, 在DNA克隆中	596
限制性核酸内切酶	459, 573
线粒体	235—236
DNA	541—542
电镜照片	235
结构	235
可通透性	236, 246, 247
线粒体ATP酶	241
线粒体DNA	541—542
线性四吡咯	390
腺苷	395
腺苷二磷酸(ADP)	182—186
ADP-核糖基化作用	
白喉毒素所致	556
霍乱毒素所致	658
S-腺苷高半胱氨酸	379
S-腺苷甲硫氨酸	379
分子模型	379
DNA的甲基化中	573
RNA的甲基化中	477
磷脂酰胆碱的合成中	351
趋化性中	708
腺苷三磷酸(ATP)	182—186
光合作用的	337—339
基因重组中的	591
基团转移潜势的	184

肌肉收缩中	639, 641—642, 643	酸盐	17	修复DNA	456—458
模型	2	小核糖核酸病毒(小RNA病毒)	577	修饰亚基	80, 287
膜运输中	672—676	小鼠卫星DNA	543	溴化氰(CNBr)	17
水解自由能	183—186	小型终板电势	692	溴化十二烷基三甲基铵(DTAB)	167
糖酵解的	202—204	缬氨霉素	680, 683	溴化乙锭	459
氧化磷酸化的	235, 241—245	缬氨酸	11	5-溴尿嘧啶	497
纤毛和鞭毛中的	649	分子模型	502	选择理论	632
脂肪酸氧化的	298	氧化	319, 323	血红蛋白(Hb)	43—75
转换率	183	协同相互作用		A	43
腺苷三磷酸-腺苷二磷酸(ATP-ADP)循环	183	DNA中	445	A <sub>2</sub>	43
腺苷三磷酸酶(ATP酶)		胶原中	147	F	43
肌肉中的	637	血红蛋白中	51, 58—59	M	73
线粒体中的	244	脂双层中	163	S	65—72
Ca <sup>2+</sup> 运输中的	643, 676	协同性反馈控制	386	$\alpha$ 链	43
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> 运输中的	672—676	协同运输	677	$\beta$ 链	43
腺苷酸环化酶	654	谢明, D.	389	$\beta$ 链结构	44—45
糖原代谢中	279	辛格, S.J.	173	$\delta$ 链	43
通过PGE <sub>1</sub> 的抑制作用	665	辛希默, R.	442	$\gamma$ 链	43
通过霍乱毒素的激活	658	新斯的明	695	Gun Hill	74
脂肪组织中的	293	锌	113	Hammersmith	74
腺苷酸琥珀酸	398	信号顺序	557	Kansas	75
腺苷酸激酶	183, 402, 644	L链的	630	Kempsey	75
腺苷酸脱氨酶	411	细菌中的	613	氨基酸顺序	43, 45—46
腺苷酰化酶	387	脂蛋白原的	613	氨甲酰化	61
腺苷酰化作用	387	信号肽	558	变构性质	49—62
腺苷酰转移酶	388	信号肽酶	558	病理学	73, 75
腺苷-磷酸(AMP)	182—183, 396	信使RNA(mRNA)	466	波尔效应	52, 60—62
合成	398	大肠杆菌中的	466	关键性残基	45—46
腺嘌呤	394, 433	发现	466—469	结构变化	55—62
罕见异构体	496	抗体L链的	630	结合CO	40—41
腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基对	438	卵清蛋白用的	553	结合CO <sub>2</sub>	60
腺嘌呤磷酸核糖转移酶	400	真核生物中的	551—554	结合DPG	59
香叶烯	368	指导翻译	511	结合H <sup>+</sup>	60—62
象重建	175—176	chi(X)形式	589	康司登斯匹灵(Constant Spring)	555
橡胶	368	胸苷5'-磷酸	395	模型	44, 49, 55
肖斯特兰德, F.	235	胸苷酸合成酶	408	胚胎的	43
消光系数	48	胸腺嘧啶	394, 433	x射线分析	43
消化酶	118—132	降解	412	四级结构	44
消旋酶	605	胸腺嘧啶二(聚)体	456	突变型	73, 494
p-硝基苯酚	122	胸腺嘧啶核糖核苷	477	CO <sub>2</sub> 的效应	52
p-硝基苯乙酸酯	122	雄激素	363	DPG的效应	53
2-硝基-5-硫代氰酸苯甲		合成	365	pH的效应	52
		雄烯二酮	365	协作结合	52, 58—62
		休伯, R.	129		

亚基结构	43—46	亚硝基	177	重组	244—245
亚基界面	55	亚硝酸	497	电子载体	238—243
亚基相互作用	55	亚油酸	292, 308	解偶联	248
血红素	32	烟草花叶病毒(TMV)	566—568	控制	248
合成	389—391	电镜照片	566, 568	氧化脱氨作用	311
肌红蛋白中的环境	33	电子密度图	564, 567	$\beta$ -氧化途径	296
降解	391—392	模型	566	氧离解曲线	50—54
模型	33	突变	492	肌红蛋白的	50
配位位置	33, 39	自装配	566—568	血红蛋白的	50
血红素A	240	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸		氧负离子	126
血红素加氧酶	392	(NAD <sup>+</sup> )	186	氧负离子穴	126, 128—130
血红素-血红素相互作用	52	反应	186	氧运载的模型化合物	40
血浆促凝血酶原激酶前体	139	模型	208	氧运载体	32
血浆胆碱酯酶	697	生物合成	409	药物反应	262, 697
血清素	389	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸		野蜂	269
血纤维蛋白	132—133	(NAD <sup>+</sup> )结合部位	207	夜盲	701
血纤维蛋白肽	133	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷		叶绿醇	368
血纤维蛋白稳定因子	139	酸(NADP <sup>+</sup> )	186	叶绿素类	331
血纤维蛋白原	133	延长因子	514	叶绿素a	331
电镜照片	139	在Q $\beta$ 复制中的	577	叶绿素b	331
血小板	132, 644	延胡索酸	220	叶绿体	331
血型糖蛋白	169	氨基酸氧化中	316, 324	电镜照片	329
血液葡萄糖水平	427	豚循环中	314—316	示意图	332
血友病	137—138	柠檬酸循环中	220	叶绿体基粒	329
循环光合磷酸化作用	337	延胡索酸酶	220	叶绿体基质	332
Y		4-延胡索酰乙酰乙酸	324	叶绿体DNA	541
吡啶染料	497	延伸因子稳定亚基(T <sub>+</sub> )	577	叶肉细胞	342
鸦片	664	盐键(salt linkage)	94	叶酸衍生物	377—380
鸦片皮质素原	665	盐键(salt links)	56—57	衣壳	565
雅各布, F.	466, 523	盐皮质激素	363	衣霉素(被囊霉素)	560
亚胺环己酮(放线菌酮)	517, 554	合成	365	伊博希(江桥), S.	642
亚氨基酸	10	盐桥	94	伊弗拉西, B.	541
亚胺甲基谷氨酸	319	盐生盐杆菌(盐细菌)	175	一级结构	23
N <sup>5</sup> -亚胺甲基四氢叶酸	377	盐酸胍	24	一碳单位	377—380
亚基	23	盐析	34	一氧化碳	64
$\sigma$ 亚基	472—473	眼镜蛇毒素	693	结合	40—41
N <sup>5</sup> N <sup>10</sup> 亚甲四氢叶酸	377, 407	羊毛甾醇	358	一氧化碳血红蛋白	64
亚历克西斯, T.	137	羊膜穿刺	354	胰蛋白酶	79
亚诺夫斯基, C.	493, 527	杨, W.	194	与糜蛋白酶同系	128
亚铁螯合酶	391	氧还电对	236—237	顺序分析中	19
亚铁离子, 在胶原羟化作		与自由能的关系	237	胰蛋白酶原	131
用中	143	标准值	237	胰蛋白酶抑制剂	130
亚铁血红蛋白	33	氧化还原对	236	胰岛瘤	599
亚线粒体颗粒	243—245	氧化磷酸化	235—252	胰岛素	
		ATP产生	241—245	氨基酸顺序	15

代谢中的作用	426	乙醛酸	343, 411	(ACP)	305
构象	661	乙酸	2	乙酰乙酰CoA	300, 317
缺乏	663	模型	2	乙酰转酰基酶	304
受体	662	乙酰胆碱得到的	694	易化交换扩散	247
胰岛素原得来的	660	N-乙酰半乳糖胺	171	易位子	594
作用	659	N-乙酰胞壁酸(NAM)	102	易位元件	591—594
胰岛素原	660	细菌细胞壁中的	605	异丙基硫代半乳糖苷	
氨基酸顺序	660	乙酰胆碱	691—697	(IPTG)	522, 678
由大肠杆菌合成的	599	乙酰胆碱受体	691—693, 697	异构化作用	198
胰岛细胞腺瘤	660	抑制剂	693, 697	异构体	496—497
胰高血糖素	279, 653	乙酰胆碱酯酶	124, 691, 694—697	异核体	171
代谢中的作用	426	机制	694	异亮氨酸	10
胰高血糖素颗粒的电镜照片	427	抑制剂	694—696	分子模型	502
胰腺核糖核酸酶	480	乙酰CoA	188	合成	385
胰腺酶原	119	丙酮酸来源的	217	氧化	319, 323
活化	131	代谢命运	422—423	异硫氰酸苯酯	17, 18
胰腺炎	131	亮氨酸来源的	322	异柠檬酸	218
胰腺胰蛋白酶抑制剂	130	模型	178, 217	异柠檬酸酶	310
移码突变	484	水解自由能	188	异柠檬酸脱氢酶	218
移码抑止	509	乙酰胆碱合成中	691	异氰酸	72
移位		脂肪酸合成中	302	异(别)乳糖	522
免疫球蛋白基因的	627	脂肪酸氧化中	296	异生化合物	364
抑制	556	作用	188	异戊二烯	355
移位酶的失活	556	乙酰CoA羧化酶	302, 304	异戊二烯单位	606
遗传密码	483—492	作控制部位	421	异戊烯焦磷酸	355, 356, 357
表	491	乙酰磷酸	184	合成	356
读码框架	485	水解自由能	185	构造单元	368
发现	483—491	乙酰基团转移势	188	异戊酰CoA	323
简并	485, 491	乙酰硫辛酰胺	224	异戊酰CoA脱氢酶	323
通用性	492	乙酰-酶中间体	123	异向效应	93
同义词	491	乙酰胆碱酯酶中	694	抑止突变	509
主要特征	491	N-乙酰葡萄糖胺(NAG)	102, 171	抑制常数( $K_i$ )	90
遗传物质	434—436	细菌细胞壁中的	604	F因子(致育因子)	592
遗传性生血性卟啉症	391	UDP-N-乙酰葡萄糖胺	605	F <sub>1</sub> 因子	245
乙醇	206	N-乙酰葡萄糖胺1-磷酸	605	$\rho$ 因子	476
酒精发酵	207	N-乙酰神经氨酸	353	R因子(抗药性因子)	591, 593
治疗用途	90	乙酰水杨酸	666	引物	
乙醇胺	160	乙酰乙酸	300	糖原合成中	277
乙醇酸	343	氨基酸氧化中	317	DNA合成中	446, 453
乙二醇	90	饥饿中	429	引物酶	453
中毒	90	亮氨酸氧化中	322	吡啶-3-甘油磷酸	383
乙内酰苯硫脲(PTH)	17—18	燃料代谢中	300	英根胡兹, J.	330
乙内酰苯硫脲-氨基酸	17—18	糖尿病中	663	英戈尔德, C.	233
乙醛	206	乙酰乙酰-酰基载体蛋白		英格拉姆, V.	68
				荧光	82

半抗体复合物	617
吡哆醛磷酸	82
荧光胺(荧光卡明)	16
营养需要量	189—190, 308, 374
硬脂酸	292
分子模型	175
尤里, D.	684
鱿鱼的轴突	688
油	367
油酸	160, 175, 292, 308
分子模型	160
有毒蘑菇	549, 647
有机氟磷酸	123, 695
诱导适合	83
己糖激酶中	208
羧肽酶A中	113, 115, 117
诱导物	522, 523
预苯酸	382
鱼藤酮	242—243
预引发中间体	453
圆盘(视盘, discs)	699
原卟啉IX	32, 390
分子模型	391
原肌球蛋白	636, 642
原胶原蛋白	142, 144
原磷脂酶A <sub>2</sub>	131
原生质体	608
原丝	648
原转变素(转变加速因子前体)	139
远侧组氨酸	38—39
约束步骤(关键步骤)	206
月桂酸	292
孕激素	363
孕烯醇酮	364
运动终板	691
运输Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup>	672—676
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATP酶	672—676
定向	672
机制	673—675
驱动葡萄糖运输中	677
抑制	675
运输抗菌素	680—684

## Z

杂交, RNA和DNA的	468
杂交瘤细胞	621
载体, DNA克隆中的	595
载体脂	606
增色效应	443
“闸制”电流	691
粘弹性技术	534
粘性末端	578
着色性干皮病	457
爪蟾基因	544—545
$\beta$ 折叠片	22
折叠中间体	27
蔗糖	286—287
蔗糖酶	286—287
真核生物	534
真核生物DNA的复制	540
真核生物的核糖体	554, 556
真核生物的RNA的加工	550—553
真核生物染色体	534—549
DNA的重复顺序	542—546
放射自显影	535
光学显微照相	534
组蛋白	535—539
真皮脆弱病	149
正反同读	459
正磷酸盐的共振形式	184
正十二烷酸	292
正碳离子在溶菌酶作用中	109—112
Z线	635, 636, 640
支架蛋白质	570
支链淀粉	286
脂蛋白	360—362
脂蛋白在细菌细胞壁中	612
脂蛋白原	613
脂多糖	610—612
脂肪酶	131, 293
脂肪酸	
必需的	308
不可逆地变成葡萄糖	301
堆积	175
对流动性的影响	174

合成	301—308
活化	294
流动性	292
膜脂中	160
命名法	291
前列腺素的前体	666
血浆水平	428
$\beta$ -氧化	293—299
脂肪酸代谢的作用	421
脂肪酸合成	301—308
反应	304—305
合成酶	306
化学计算	305
控制	308
NADPH的来源	307
能力学	304
去饱和化	308
延长	308
脂肪酸合成酶	306
$\beta$ -脂肪酸释放激素	665
脂肪酸氧化	293—299
ATP产生	298
反应顺序	296, 298
脂肪细胞	291, 292
脂肪酰基肉碱	425
脂肪酰CoA: 肉碱脂肪酸转移酶	295
脂肪酰CoA脱氢酶	239
脂肪组织	292
代谢轮廓	424
代谢性相互交换	424—425
脂解作用	293
通过PGE <sub>1</sub> (前列腺素E <sub>1</sub> )抑制	665
脂类	160
胆汁盐的增溶溶解	359
脂类A在细菌细胞壁中的	610—611
脂泡	164
脂双层	162
作用力	163
自动装配	163
脂质体	164
直链淀粉	286
植物中的C <sub>4</sub> 途径	342—344



指令理论	620	轴纤丝	649	顺序测定	503
指纹法	68	朱克坎德尔, E.	75	统一的设计	503—504
血红蛋白的	68—69	$\beta$ 珠蛋白基因	494—495	稀有的碱基	503
酯的水解	79, 121	珠蛋白基因图	555	酵母丙氨酸 tRNA 的顺序	
致癌病毒	579—584	主动运输	671		503
致癌物质	497	主链	12	抑止基因突变型	508
致死合成	229	转氨酶	311	ATP-ADP 转运酶	247
致育 (F) 因子	592	转氨作用	311—313	$\beta$ -转折	23
置换突变	496	转导蛋白	704	装饰丝	640
质粒	591—594	转导噬菌体	593	紫膜	175
pBR322	597	转琥珀酰酶	226	紫膜蛋白	175
pSC101	596	转换	496	紫膜蛋白中的视黄醛	344
青霉素的	594	转换数	86	紫外光在维生素 D 的合成中	
质膜	158	转录	465		367
质体醌	336	电镜照片	472	自动调节	531
质体蓝素	337	方向	474	自动装配	
铜位点	337	RNA 聚合酶	469—472	烟草花叶病毒的	566—568
质体兰素中的铜	337	控制	522—532	脂双层的	163
质子泵	243—244	链的选择	471	自体免疫病症	698
质子梯度	241—243, 251	起始	472—474	自旋标记作探测物	177
动力传送	251	抑制	478—479	自由能	179—186
光合作用中	336—339	终止	475—476	反应自发进行的重要标准	
主动运输中	678	转醛醇酶	255—257		179—180
质子移动力	241	机制	261—262	活化的	81
光合作用中	336—339	转羧酶	303	与 $K'$ 的关系	181
中期染色体		转肽作用	607, 609	ATP 是通用货币	182
荧光显微照相	540	转糖基作用	112	自由能转变	251
终止顺序	527—528	转铁蛋白	8	棕榈油酸	292, 308
终止信号	492	糖单位	562	阻遏物	523—526
肿瘤		转酮醇酶	255—257	阿拉伯糖操纵子上的	526
病毒病因学	579	机制	260—261	和操纵基因的相互作用	523
化学治疗	408	光合作用中	341	乳糖操纵子的	523—526
转化细胞	580	戊糖磷酸途径中	255—257	色氨酸操纵子的	527
肿瘤病毒	579—584	转酰胺基酶	134	$\lambda$ 噬菌体的	529—532
SV 40 肿瘤病毒	580—582	转酰胺基作用	134	$\lambda$ 阻遏物	529—532
蛋白质	582	转移 RNA (tRNA)	503	组氨酸	384
电镜照片	580, 581	氨基酸连接部位	483	组氨酸磷酸	384
肿瘤病毒引起的转化作用		大肠杆菌中的	466	组氨酸-醛醇交联	152
	580—584	反密码子	503, 505	组氨酸	11
重 [H] 链	619	功能	483—484	合成	383—384
重酶解肌球蛋白	638	构象	504—505	降解	317—318
重症肌无力	697	模板识别部位	483	组胺	389
周质空间	610	拼接	551	组成酶变种	523
轴向取代基	197	前体	551	组蛋白	535—539
轴突膜	688—689	识别中的摆动	506—507	H 4 的氨基酸顺序	536

组蛋白基因	546
组织因子	138
最大速度 ( $V_{\max}$ )	85, 86
测定	85
定义	85
数据表	87
意义	86
作用中心 (反应中心)	332

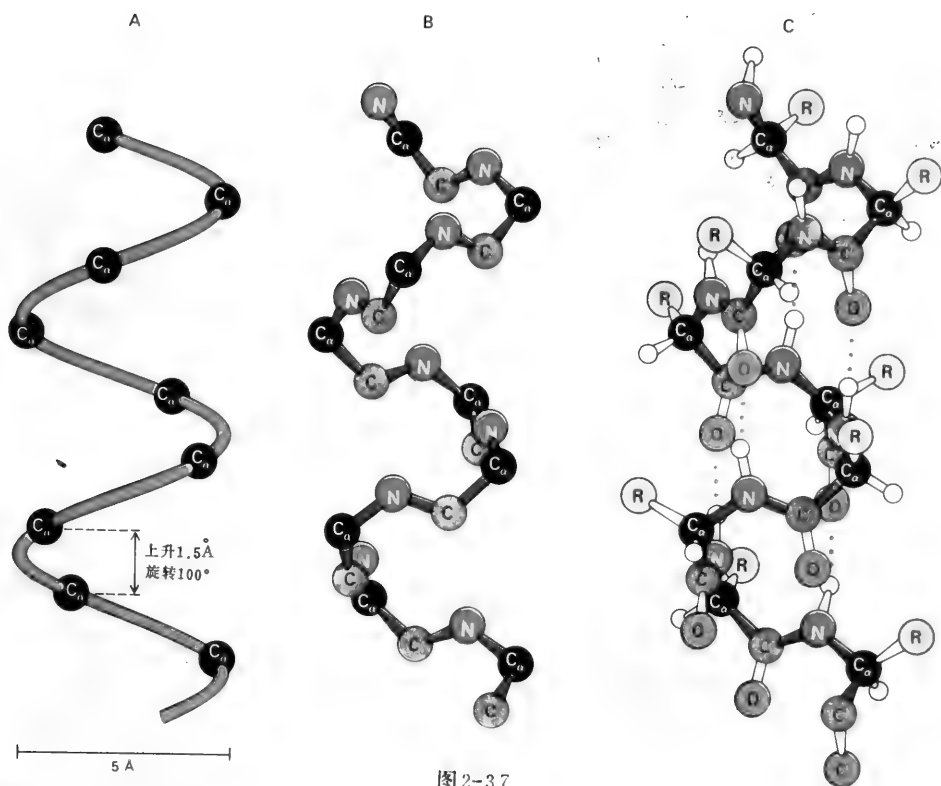


图2-37

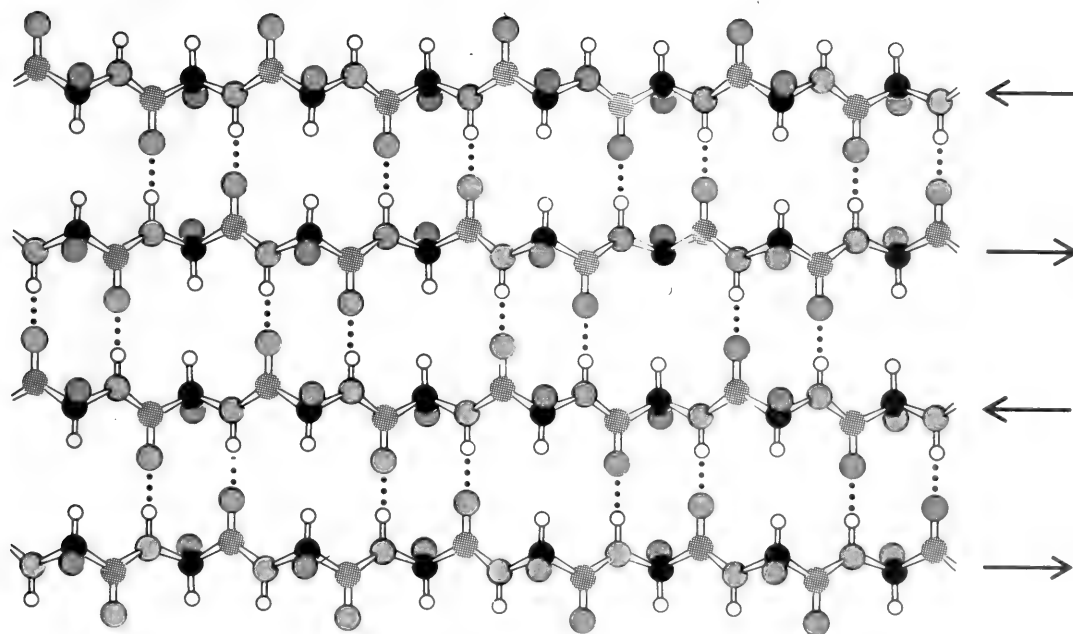


图2-41

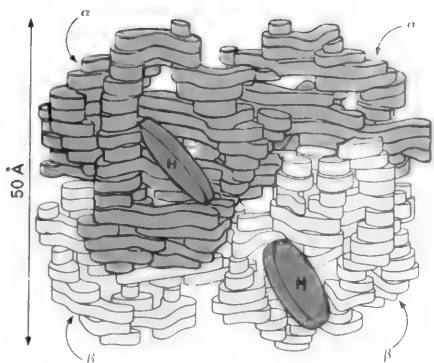


图3-24



图4-1

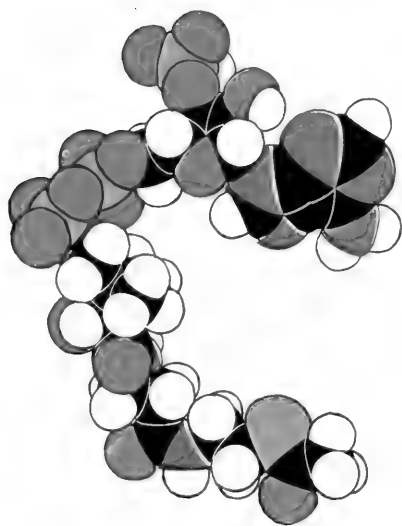


图13-1

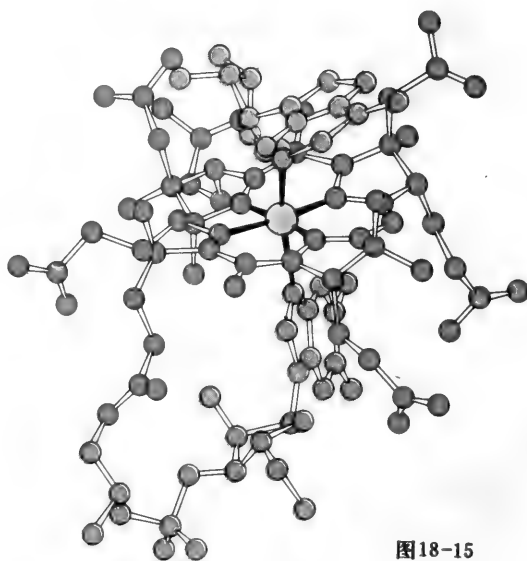


图18-15

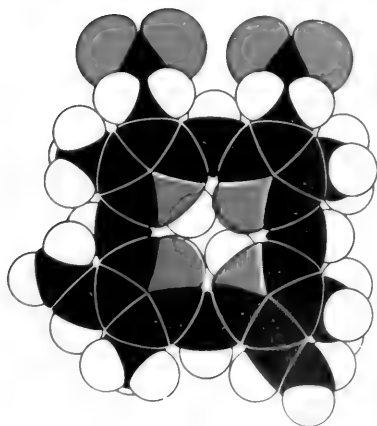


图21-22

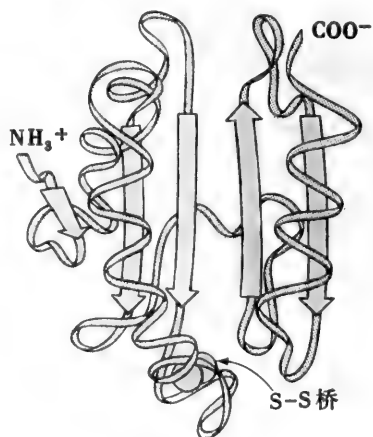


图22-19

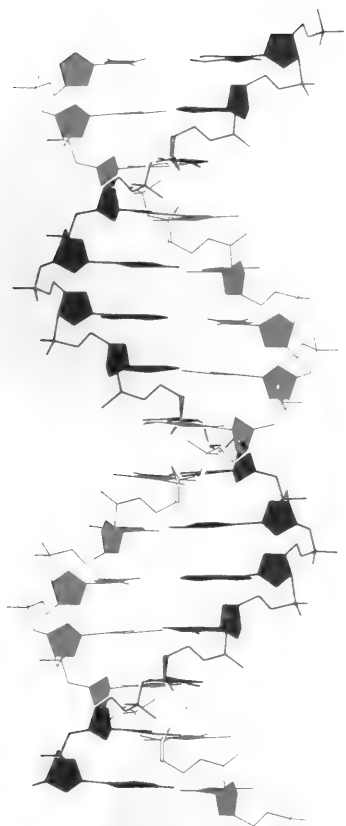


图24-7

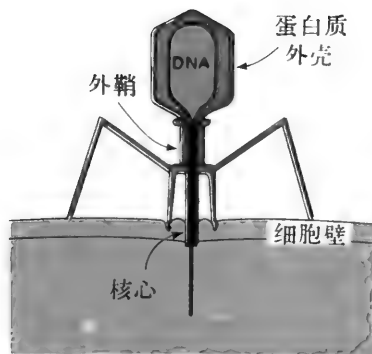


图 24-5

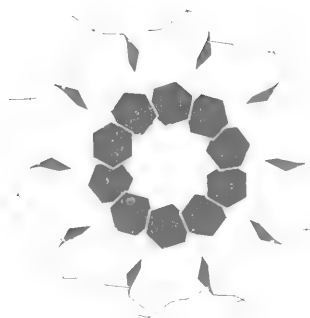


图24-8

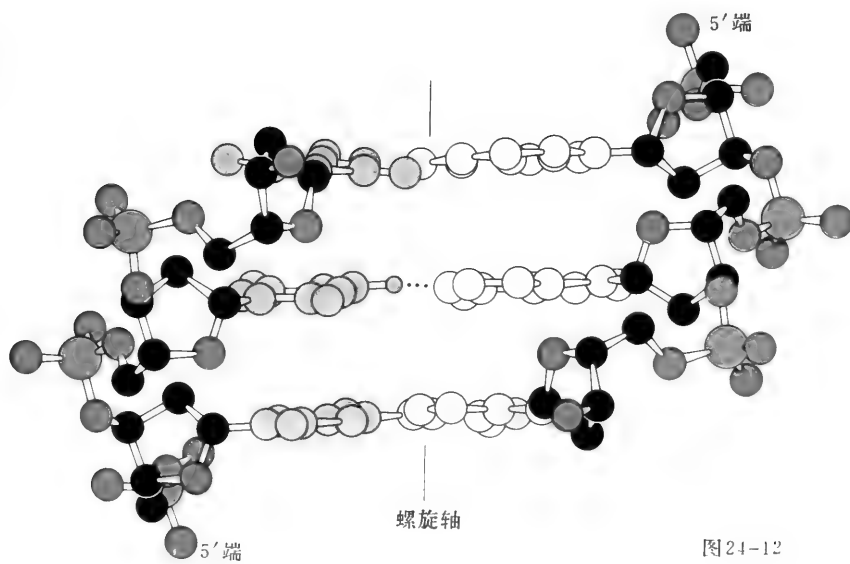


图24-12

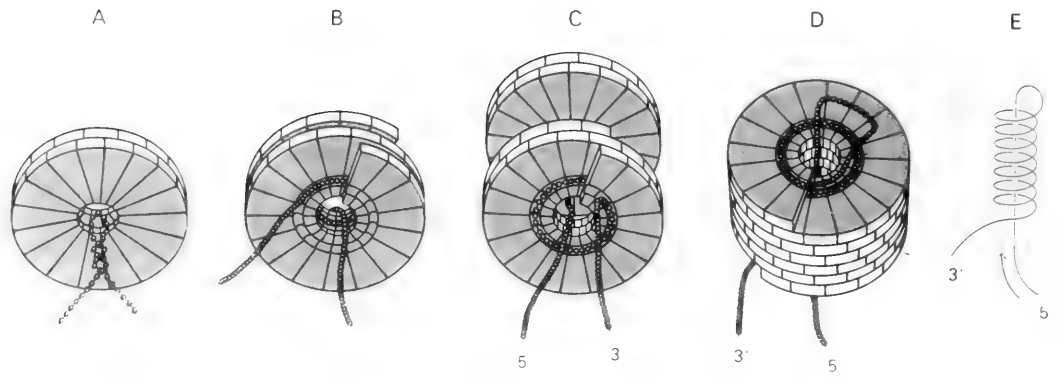
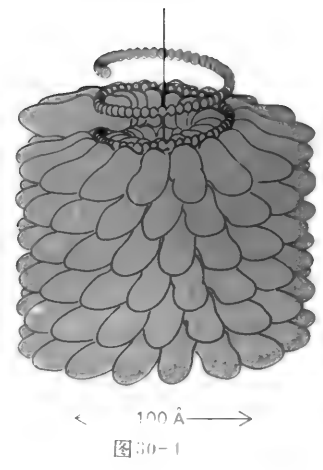
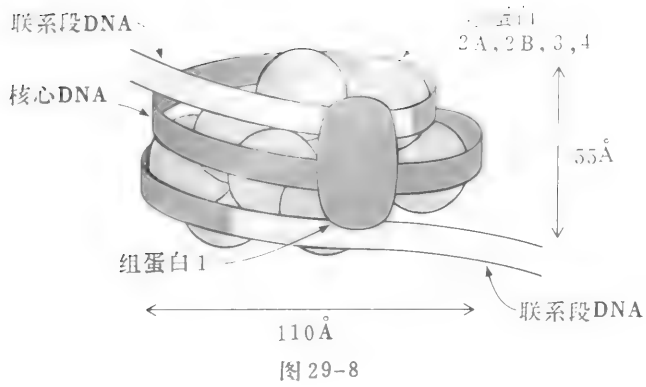
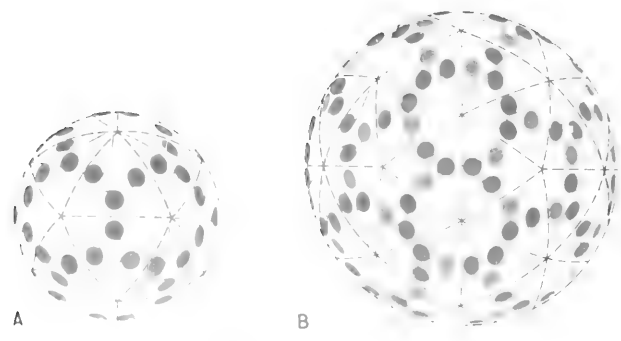


图 30-9



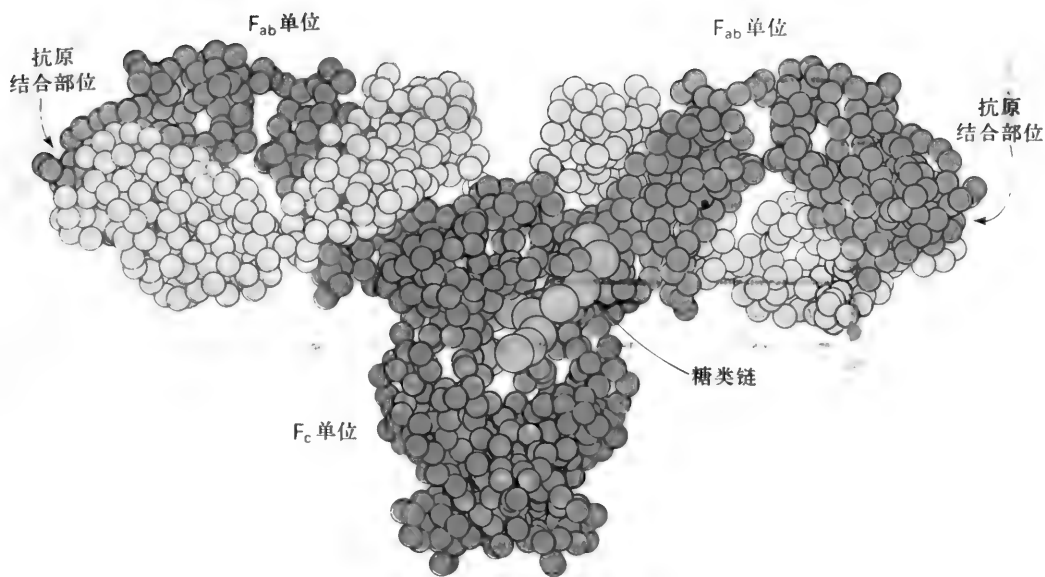


图 33-19

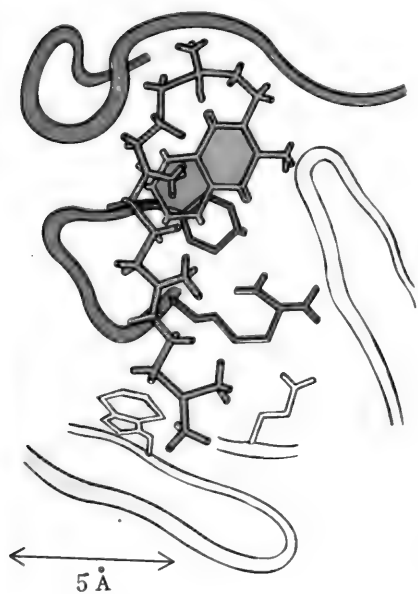


图33-20

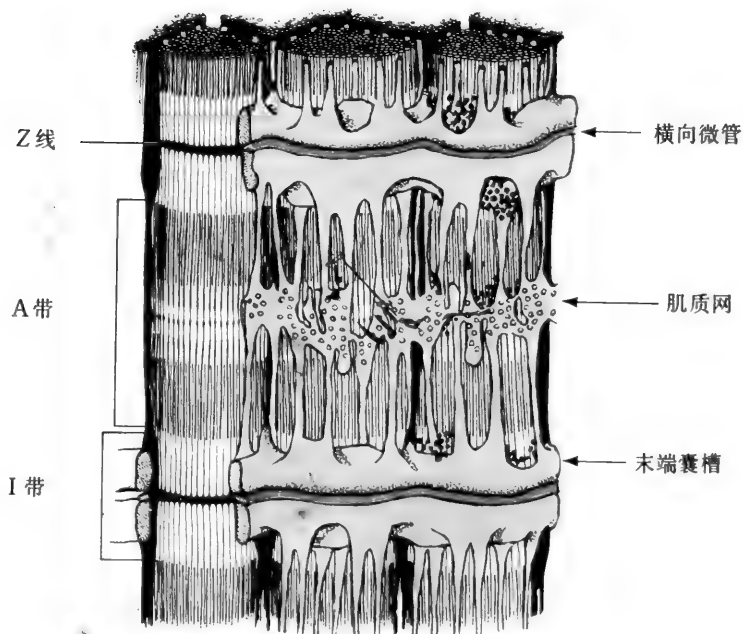


图34-20

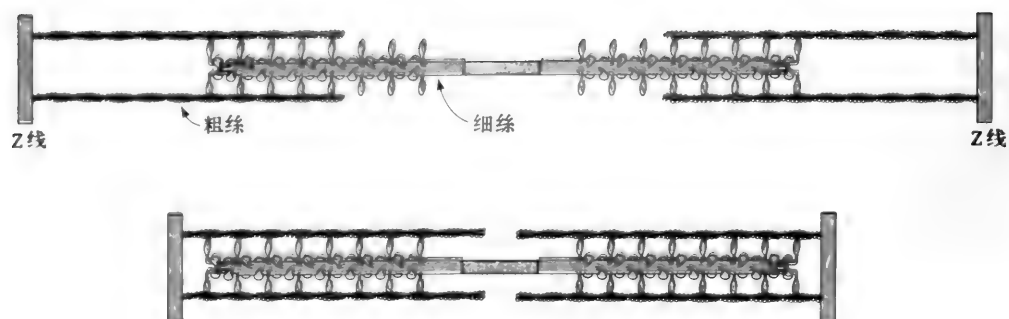


图 34-16

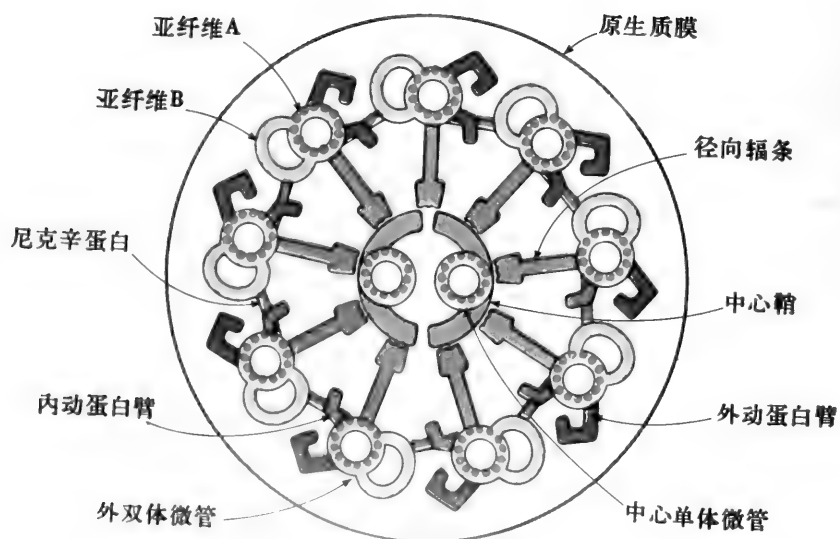


图 34-32

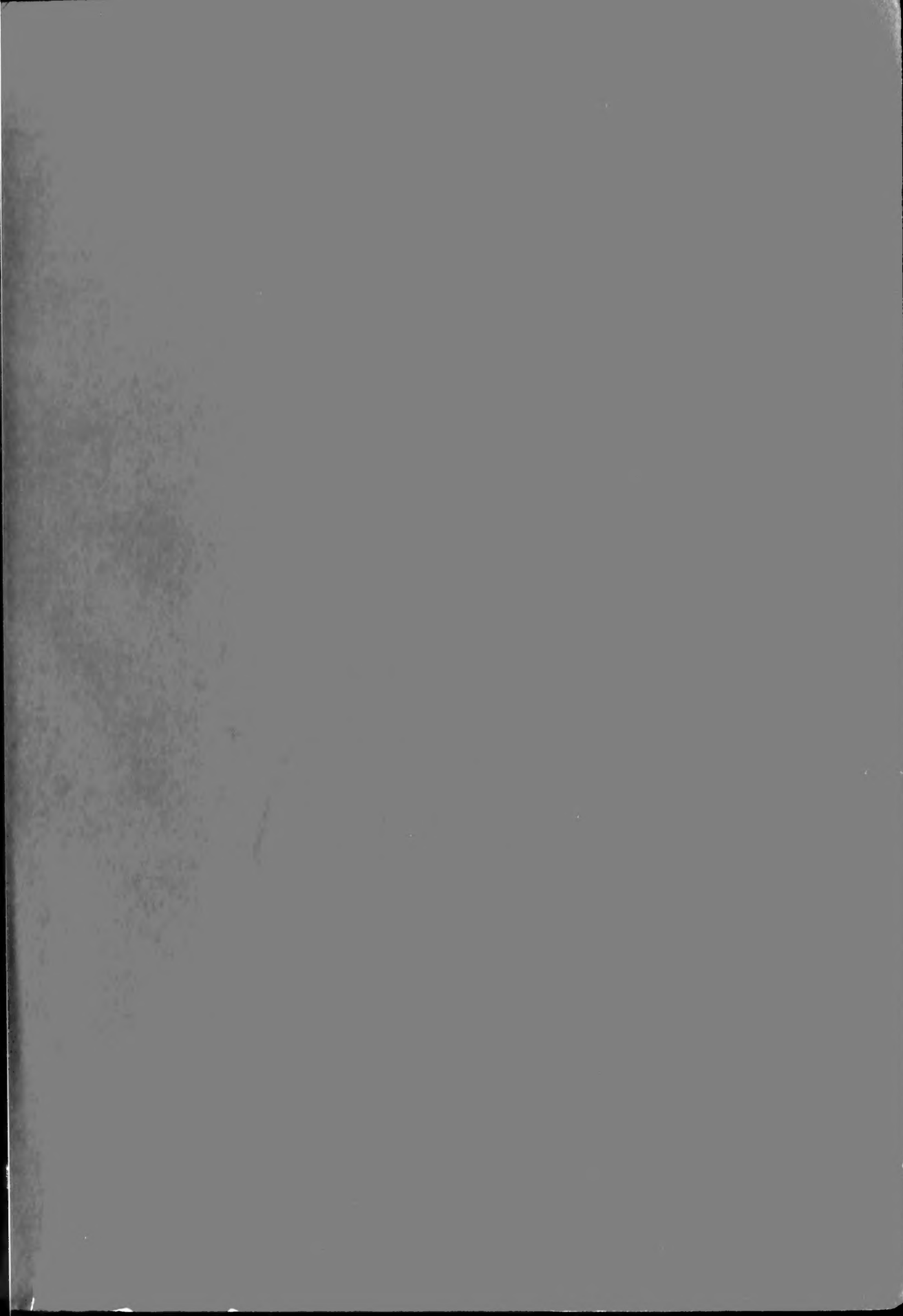












收到日期	91.3.3
来源	北大出版社
书价	29.60
书号	2280891
日期	91.3.1.

中科院植物所图书馆



S0003390

25602

58.173  
349

生物化学

1990

借者	还期	借者	还期
王明	8月17.3	9.	
贾志	92.8.8		
王明	92.10.20		
王明	97.12.1		
王明	2003.11.2		
	(王合宇)		

58.173  
349

### 注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

25602

781



ISBN 7-301-00405-2/O·066

定 价：29.60元